

Cirkuláló mikroRNS-ek mint potenciális minimális
maradék betegség biomarkerek gyermekkori akut
limfoblasztos leukémiában

Doktori értekezés

Rzepiel Andrea

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Erdélyi Dániel János, MD, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Gaál Zsuzsanna, MD, Ph.D., Csecsemő- és
gyermekgyógyász szakorvos

Dr. Rónai Zsolt, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Rosivall László, Ph.D., D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Prof. Dr. Vásárhelyi Barna, Ph.D., D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Szabó László, Ph.D., főiskolai tanár
Dr. Fogarasi András, Ph.D., D.Sc., egyetemi magántanár

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés	5
1.1. Gyermekkori akut lymfoblasztos leukémia és előfordulása	6
1.2. Minimális maradék betegség	11
1.3. A microRNS-ek biogenezeise és funkciói malignus megbetegedésekben	14
1.3.1. MikroRNS biogenezis	14
1.3.2. MikroRNS-ek malignitásokban	16
1.4. Cirkuláló mikroRNS-ek	17
1.4.1. A vérplazma és vérérszérum eltérő mikroRNS mintázata	17
1.4.2. MicroRNS-ek mint biomarkerek	17
1.5. MicroRNS-ek a limfopoetikus folyamatokban és limfoid leukémiában	18
1.6. Extracelluláris vezikulák	20
1.6.1. Extracelluláris vezikulák hematológiai kórképekben	20
1.6.2. Exoszómális mikroRNS-ek	21
2. Célkitűzések	22
3. Módszerek	23
3.1. ALL biobank	23
3.2. A vizsgált betegpopuláció	24
3.3. Betegminták - vérlemezke-mentes plazma	28
3.4. RNS izolálás és cDNS szintézis	28
3.5. Exoszóma gazdag frakció	28
3.6. MikroRNS profil egyedi TLDA mikrofluidikus kártyán	29
3.7. Kvantitatív PCR	31
3.8. Statisztikai elemzés	32

4. Eredmények	33
4.1. A felfedező populáció mikroRNS expressziós mintázata TLDA kártyán	33
4.2. MikroRNS expresszió kibővített populáción qPCR módszerrel vizsgálva	39
4.2.1. Diagnóziskori de novo ALL perifériás vér PFP mikroRNS expressziója kontroll perifériás vér PFP-hez viszonyítva	39
4.2.2. Az indukciós terápia alatti mikroRNS expressziós szint változások a teljes ALL csoportban	40
4.2.3. Az indukciós terápia alatti mikroRNS expressziós szint változások alcsoporthoz viszonyítva	43
4.3. MikroRNS expressziós szintváltozás korrelációja MRD-vel és egyéb prognosztikai faktorokkal	47
4.3.1. A teljes ALL populáció mikroRNS expressziós változása MRD-vel és egyéb prognosztikai faktorokkal korrelálva	47
4.3.2. ALL alcsoporthoz viszonyítva mikroRNS expressziós változása az MRD-vel és egyéb prognosztikai faktorokkal korrelálva	50
4.4. Az exoszóma gazdag frakció és PFP miR-128-3p és miR-222-3p expressziós mintázata perifériás vérből ultracentrifugálással izolált mintákon	52
5. Megbeszélés	57
6. Következtetések	67
7. Összefoglalás	68
8. Summary	69
9. Irodalomjegyzék	70
10. Saját publikációk jegyzéke	86
11. Köszönetnyilvánítás	89

Rövidítések jegyzéke

ABC: absolute blast count, abszolút blaszt szám

ALC: absolute lymphocyte count, abszolút limfocita szám

ALL: akut limfoblasztos leukémia

ASO-PCR: Allele-specific oligonucleotide polymerase chain reaction, allél-specifikus oligonukleotid kvantitatív PCR

BM: bone marrow, csontvelő

BMI1: B lymphoma mouse moloney leukemia virus insertion region-1

CTC: circulating tumor cell, cirkuláló tumor sejt

ctDNA: circulating tumor DNA, cirkuláló tumor DNS

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

FC: flow cytometry, áramlási citometria

FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció

HD: hiperdiploid

HSCT: hematopoietic stem cell transplantation, hematopoetikus őssejt transzplantáció

KIR+: központi idegrendszer érintett

M1: a csontvelői blasztok aránya $< 5\%$

M2: a csontvelői blasztok aránya $\geq 5\%$ de $< 25\%$

M3: a csontvelői blasztok aránya $\geq 25\%$

MFC: multiparaméteres áramlási citometria

miR: mikroRNS

MRD: minimal residual disease, minimális maradék betegség

mRNS: messenger RNS

NGS: next generation sequencing, újgenerációs szekvenálás

PB: peripheral blood, perifériás vér

PCR: polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció

PFP: platelet-free plasma, vérlemezke-mentes plazma

RNase: ribonuclease, ribonukleáz

RNS: ribonuklein sav

TCR: T cell receptor, T sejt receptor

TLDA: TaqMan Low Density Array

TRBP: transactivation response RNA binding protein

WBC: white blood cell, fehérvérsejt

1. Bevezetés

A gyermekkori akut limfoblasztos leukémia ismerten a leggyakoribb gyermekkori malignus megbetegedések közé tartozik. Hazánkban 1990-es évek óta évente nagyjából 60-70 új esetet diagnosztizálnak. A Children's Cancer Group adatai szerint 1968-70 között 402 ALL-es gyermeket kezelve az 5 éves túlélés csak 20% közeli volt, aztán a néhány évvel később, 1975-78 között már 60% felett volt a kezelt 1300 beteg 5 éves túlélése. 1993-95 között pedig már ugyanez az adat 80% körülre emelkedett 1500 ALL-es gyermeket tekintve (1). Ennek háttérében számos tényező állhat, azonban az egyre korszerűbb kezelések és a fejlődő laboratóriumi eljárások egészen biztosan igen fontos szerepet játszottak és mind a mai napig játszanak ennek elérésében, fenntartásában és tovább emelésében.

A mikroRNS-eket a 2000-es évek elejéig nem tartották fontosnak, nem is sejtették azok jelentőségét. A technika fejlődésével azonban elkezdődött a mikroRNS-ek biogenezisének és funkcióinak feltérképezése. Természetesen a különböző kórképek patogenezisében is vizsgálták és máig vizsgálják a szerepüket és ebből következően azok terápiában való felhasználásuk is népszerű kutatási területnek számít.

A keringő mikroRNS-ek vizsgálatának apropója, az a tény, hogy számos testfolyadékából sikerült már kimutatni őket, így felvetődik a kevésbé invazív biomarkerként való alkalmazásuk lehetősége. Az RNáz aktivitásnak való ellenállásuk pedig köszönhető – többek közt – az extracelluláris vezikulákba való csomagolásuknak. Ezzel egy másik rohamosan fejlődő témakör nyílik meg.

Ennek a három témakörnek az összekapcsolása révén pedig a precíziós medicina, azaz a személyre szabott orvoslás felé tehetünk egy újabb lépést.

1.1. Gyermekkori akut lymfoblasztos leukémia és előfordulása

Az akut limfoblasztikus leukémia (ALL) a hematopoetikus őssejtek klonális megbetegedése (2). A gyermekkori akut leukémia a leggyakoribb malignitás az 1-18 éves populációban, mely nagyjából 30%-át teszik ki az összes gyermekkori malignus megbetegedéseknek. Ez hazánkban évi 70-80 új leukémiás megbetegedést jelent (3). Az altípusok közül a leggyakoribb, mintegy 85%-ot kitevő csoport a prekursor B-sejtes alcsoporthoz (pre B-ALL). A maradék 15% szinte kizárólag a T-sejtes altípushoz tartozik (4).

A betegségre a nem specifikus tünetek közé sorolható 1-2 hete tartó, kezelésre nem múló láz, a fáradékonyság, végtagfájdalom és nyirokcsomó megnagyobbodás tartozik. A vérképzés zavara miatt anémia jelentkezik, mely sápadtsággal jár, szédüléssel és szapora szív működéssel. A bőr és nyálkahártya bevérvései oka a vérlemezkeszám csökkenés, míg a visszatérő fertőzések, láz hátterében a fehérvérsejtek nem megfelelő működése áll. A csontfájdalmat a csontvelői infiltráció okozza, a malignus sejtek térfoglalása következtében. A nyirokcsomó megnagyobbodás, hepato- és splenomegalia hátterében a nyirokrendszer inváziója áll. Érintett lehet emellett a központi idegrendszer, a herék, petefészek, a csontok, ízületek, vesék, a szem és a bőr is (5).

A betegségben jellemző sejtek a limfoblasztok, melyek a csontvelőben (mindig) és vérben (az esetek többségében) is megtalálhatóak. Az ALL diagnózisához minimum 20% a blasztok aránya a magvas sejtekhez viszonyítva a csontvelői és vérmintákban vizsgálva (2).

B-ALL esetén számos kromoszomális abnormalitás ismert. Ezekről azt tartják, hogy jellemzően korai, kezdeti események a leukemogenesis során, olyan géneket bevonva amelyek regulátorok a sejt közötti jelátviteli folyamatokban, tumor szuppresszorok, illetve a limfoid differenciációban részt vevők. Lehetnek kromoszóma számbeli eltéréssel, kromoszomális transzlokációval vagy újrendeződéssel, de akár deléciókkal járók is, egyéb genetikai mutációk mellett (2).

A B sejtes limfoblasztikus leukémiák esetén 9 visszatérő genetikai abnormalitást jegyez az Egészségügyi Világszervezet (WHO) (6). Gyermekekben gyakori az ETV6-RUNX1

más néven t(12;21) transzlokáció. Ebben az esetben, a transzlokáció következtében létrejön egy fúziós fehérje, amely gátolja a RUNX1 működését, ami az egyik fő regulátor a hematopoézis során (7). Ez a kromoszómális abnormalitás a gyermekkori ALL 25%-ban van jelen.

Hiperdiploiditás és hipodiploiditás is előfordulhat, előbbi esetén > 50 , de < 66 kromoszómája van a betegnek egyéb szerkezeti abnormalitás nélkül, míg utóbbi esetén a normálisnál kevesebb kromoszóma figyelhető meg. Hiperdiploiditás az esetek negyedében jellemző. Ehhez a genetikai eltéréshez jó prognózis társul. Azonban ez nagyban függ attól, hogy melyik kromoszómák triszómiája alakul ki. A legkedvezőbb prognózist a 4, 10, 17-es kromoszóma triszómiája jelenti (2). A hipodiploid ALL csoport prognózisa lényegesen gyengébb.

A további alcsoportok részletezésétől eltekintek, mert a munkám során ilyen alcsoportba tartozó betegek mintáival nem foglalkoztam.

A betegek kezelési protokollja országonként, régióként eltérő. Magyarországon a kutatásom során az ALL IC-BFM 2009 protokoll szerint történt a betegek kezelése.

A rizikócsoport besorolás a következő:

Standard, azaz alacsony rizikó (SR) besorolásba esik az a beteg, akire az alábbiak közül mindegyik jellemző:

- életkora ≥ 1 év – < 6 év
- a perifériás vér 8. napon $< 1,000$ blaszt/ μ L tartalmaz
- a kezdeti fehérvérsejtszám $< 20,000/\mu$ L
- áramlási citometriával (FC) mérve a csontvelőben mért blasztok aránya $< 0,1\%$ a 15. napon
- M1 (a csontvelői blasztok aránya $< 5\%$) / M2 (a csontvelői blasztok aránya $\geq 5\%$ de $< 25\%$) csontvelő a 15. napon
- nem M2/M3 (a csontvelői blasztok aránya $\geq 25\%$) csontvelő a 33. napon

High, azaz magas rizikó (HR) besorolásba esik az a beteg, akinél az alábbiak közül legalább egy teljesül:

- M3 csontvelő a 15. napon

- FC MRD >10% a 15. napon
- perifériás vér a 8. napon $\geq 1,000$ blaszt/ μ L
- M2 vagy M3 csontvelő a 33. napon
- t(9;22) vagy t(4;11)
- hiperdiploid ≤ 44 kromoszómaszámmal

Intermediate azaz közepes rizikó (IR) besorolásba esik minden beteg, aki az sem az SR-be sem a HR-be nem stratifikálható.

A betegek kezelése a következő fázisokra osztható: indukció, korai intenzifikáció, konszolidáció, reindukció, késői reintenzifikáció és fenntartó kezelés (8).

Az indukció során, amely az első hónapot öleli fel és célja, hogy elpusztítsa a kezdeti daganatos sejttömeg zömét, prednizolon terápiát írnak elő emelkedő adagban a 8. napig, majd állandó prednizolon mellett vincristin és daunorubicin kezelés is megkezdődik a 8. napon. Ez utóbbi a 15. napon ismétlődik, míg vincristine-t a 22. és 29. napon is kapja a beteg (IR és HR ágon a daunorubicin is ismétlődik a 22. és 29. napon is, az SR ágon nem). Az aszparagináz a 12. napon lép be a kezelési rezsimbe. Az intratekális metotrexát pedig az indukciós kezelés során a központi idegrendszeri érintettség függvényében (központi idegrendszeri érintettség vagy traumatikus lumbal punctio esetén) akár 5 alkalommal is szerepelhet. A korai intenzifikáció 4 hetes kezelése során citozin-arabinozid, ciklofoszfamid, 6-merkaptopurin és metotrexátot kapnak a betegek. A 8 hetes konszolidációs szakasz célja a még túlélő blasztok elpusztítása és a központi idegrendszeri érintettség megelőzése melyhez a vér-agy gáton is átjutó gyógyszereket (metotrexát, 6-merkaptopurin) alkalmaznak. A maradék leukémiás sejtek elpusztítása a célja a reindukciónak és a késői reintenzifikációnak, mely 7 hetet ölel fel. Ekkor a kezdeti indukció során alkalmazott gyógyszereket kapja ismét a beteg. A két éven át tartó, fenntartó kezelés a betegség visszatérését, a késői csontvelői relapszust igyekszik megakadályozni orális metotrexáttal és 6-merkaptopurinnal (8). A kezelések közt jellemző szünetek a csontvelő regenerálódásának engednek teret.

A túlélési mutatók az elmúlt évtizedek során folyamatos javulást mutatnak, az öt éves túlélés napjainkban eléri a 83%-ot (3). A korai terápiás válasz alapján történő stratifikáció és a minimális maradékbetegség (MRD) monitorozása igen fontos faktora a magas túlélésnek.

A központi idegrendszeri érintettség besorolása ALL IC-BFM 2009 protokoll szerint a következő:

KIR 1:

- Nincs klinikai bizonyíték a központi idegrendszeri érintettségre
- Képalkotó eljárással (CT/MRI) nem mutatható ki a központi idegrendszerbeli eltérés
- Szemfenék vizsgálattal eltérés nem mutatható ki
- A fentiekén túl a gerincvelői folyadék blaszt-mentes

KIR 2:

- Cytospinen a blasztok egyértelműen azonosíthatóak és a vörösvértest:fehérvérsejt $\leq 100:1$, $\leq 5/\mu\text{L}$ sejtszám esetén (nem traumatikus lumbálpunkció, a CSF vért nem tartalmaz)
- Cytospinen limfoblasztok azonosíthatóak és a vörösvértest:fehérvérsejt $> 100:1$ (traumatikus lumbálpunkció, a CSF tartalmaz vért)
Traumatikus lumbálpunkció, a kezdeti fehérvérsejtszám $> 50\,000/\mu\text{L}$

KIR 3:

- Képalkotó eljárással (CT/MRI) kimutatható központi idegrendszeri érintettség
- Agyideg bénulás, akár blaszt-mentes CSF vagy a koponyában nem körülírt térfoglaló lézió mellett is (CT/MRI-vel)
- Retina érintettség (blaszt-mentes CSF vagy negatív CT/MRI esetén is)
- Nem traumatikus lumbálpunkció esetén, ahol a sejtszám $> 5/\mu\text{L}$ és a cytospinen nagyrészt blasztok láthatóak.
- Amennyiben a vérrel való szennyezettség kétséges a KIR státusz megállapítható ha az alábbiak közül bármelyik igaz:
 - Sejtszám: $> 5/\mu\text{L}$
 - + nagy része blaszt (cytospin)
 - + vörösvértest : fehérvérsejt $\leq 100:1$ (cytospin)

- Sejtszám: $> 5/\mu\text{L}$
+ magasabb a blasztok százalékos aránya a gerincvelői folyadékban, mint a perifériás vérben

Kutatásunk során a KIR 2 és KIR 3 betegeket a központi idegrendszer érintett (KIR+) kategóriába soroltuk.

1.2. Minimális maradék betegség

Minimális reziduális vagy maradék betegség (minimal residual disease, MRD) alatt a malignus sejtek alacsony (5% alatti) szintjét értjük a kezelés elkezdése után teljes remisszióban, amelyet valamilyen érzékeny diagnosztikus eljárással ki lehet mutatni.

Tradicionálisan a kezelésre adott választ mikroszkópos analízissel határozták meg a csontvelőben illetve a vérben. Ez a módszer azonban igen kevésbé szenzitív, különösen ALL-ben, ahol rendkívül nehéz a leukémiás blasztokat megkülönböztetni a limfoid prekursoroktól és az aktivált érett limfocitáktól.

Négy évtizede Janossy és munkatársai elkezdtek a remissziós státuszt vizsgálni ALL-es betegeknél egy, a morfológiai vizsgálatnál érzékenyebb módszerrel (9). Megfigyelték, hogy T sejtés ALL-ben a sejtek expresszálnak TdT-t és T sejt markereket, míg egészséges emberekben sem a perifériás vérben, sem a csontvelőben nem jellemzőek ezek a markerek. Tehát sejt markerek kombinációját használva állapították meg, hogy a beteg remisszióban van-e. Az immunológiai markerek segítségével így a maradék leukémiás sejtek azonosítása vált lehetővé. Monoklonális antitestek és az áramlási citometria fejlődésével pedig T-sejtés mellett B-ALL-ben is lehetővé vált az MRD detektálása (10). Ezzel egy időben a PCR technika fejlődését felhasználva számos kutatócsoport fúziós transzkriptumokat amplifikált ALL sejtekben és bennük az antigén receptor géneket vizsgálta MRD detektálás céljából (11-13).

Elkülöníthető 3 csoport, melyek különböző módszerek segítségével további információt nyújtanak az áramlási citometriás vizsgálatok mellett. Az első csoport, amelyek a normális fejlődés során is expresszálnak a sejtek, de csak bizonyos szövetek sejtjeire jellemző. Ez a T-ALL-re jellemző csoport (14). A második, leukémia specifikus csoportba a fúziós proteinek jellemzőek, mint például a BCR-ABL1, ETV6-RUNX1. A harmadik csoportba olyan markerek sorolhatók, melyek expresszálódnak a limfohematopoézis során, de a leukémiás sejtekben abnormális kombinációban vannak jelen (10, 15-17).

A PCR során használt targetek két csoportra oszthatók. Az egyik targetcsoportba a génfüziók sorolhatók, úgymint a már korábban említett BCR-ABL1, ETV6-RUNX1. Ezen esetekben egy aberráns mRNS transzkriptum figyelhető meg a leukémiás sejtekben (18-19). Míg a másik csoportban a PCR targete az immunglobulin (Ig) és T sejt receptor (TCR) gének klonális újraszerveződése (20).

MRD vizsgálat céljából tehát mind az áramlási citometria, mind a PCR technika elterjedt. Természetesen összehasonlításuk sem maradhat ki a szakirodalomból. Úgy találták, hogy amennyiben az MRD legalább 0,01%-ban van jelen az adott mintában, a kétféle detektálási módszer eredménye közel azonos (21-23).

Az MRD legnyilvánvalóbb alkalmazása a kezelésre adott korai válasz és azoknak a betegek az azonosítása, akik morfológiai remisszióban vannak, de még mindig jelen van egy adott határérték felett leukémia. Az MRD detektálása a terápia első 2-3 hónapjában (kezelési protokolltól függően) a relapszus legerősebb prediktora (24-25). Az indukciós terápia végén az 1%-nál nagyobb MRD-vel rendelkező betegek relapszus rátája igen magas, akár hétszer magasabb, mint az SR és IR csoportba sorolt betegeké (25).

A betegek stratifikálása kiemelkedően fontos a megfelelő, egyénre szabott terápia szempontjából. Az MRD eredmény befolyásolja a rizikócsoport besorolást, a további kezelés intenzitását. Perzisztens MRD esetén őssejttarnszplantáció (HSCT) merül fel.

További MRD detektálási technikák közt szerepel a multiparaméteres áramlási citometria (MFC), az allél-specifikus oligonukleotid kvantitatív PCR (ASO-PCR), a digitális PCR és az újgenerációs szekvenálás (NGS) (26). A technikák előnyei és hátrányai az 1. táblázatban szerepelnek (Sánczhez és mtsai nyomán) (27-28).

1. táblázat. MRD detektálási technikák jellemzői.

Módszer	Előny	Hátrány
FC	<ul style="list-style-type: none"> • Gyors • Abszolút kvantifikáció • Sejt szintű információt nyújt • Széles körben elérhető 	<ul style="list-style-type: none"> • A változó antigén expresszió fals negatív eredményhez vezethet • Gyakorlatot és szaktudást igényel • Közepes szenzitivitású (10^{-3}-10^{-5}) 8 szín alatt
ASO-PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Magas szenzitivitás (10^{-5}) 	<ul style="list-style-type: none"> • Időigényes betegspecifikus primer tervezés • Optimális DNS mennyiség is minőség szükséges
Digitális PCR	<ul style="list-style-type: none"> • Abszolút kvantifikáció • Magas szenzitivitás (10^{-6}) • PCR inhibitorok mellőzése a target szekvenciák kompartmentalizálása révén 	<ul style="list-style-type: none"> • Standardizáció hiánya • Új variánsok felfedezése nem lehetséges • Allél-specifikus design
NGS	<ul style="list-style-type: none"> • Magas szenzitivitás (10^{-6}) • Egyén-specifikus primer nem szükséges • Sokoldalú 	<ul style="list-style-type: none"> • Standardizáció hiánya • Magas bioinformatikai szaktudást igényel • Drága

FC: áramlási citometria, ASO-PCR: allél-specifikus oligonukleotid kvantitatív PCR, NGS: újgenerációs szekvenálás

Magyarországon kutatásom ideje alatt, az ALL IC-BFM 2009 protokoll szerint az MRD követés áramlási citometriával történt.

1.3. A microRNS-ek biogenezise és funkciói malignus megbetegedésekben

1933-ban Ambros és Ruvkun kutatócsoportjai írták le az első mikroRNS-t (miR), a lin-4-et *Caenorhabditis elegans*-ban (29-30).

A miR-ek rövid, ~22 nukleotid hosszúságú, nem kódoló RNS-ek. A legtöbb miR a DNS szekvenciáról íródik át primary miR-é (pri-miR) majd precursor-miR-é (pre-miR) és végül érett miR-é. Jellemzően a target mRNS 3'UTR régiójához kapcsolódva annak expresszióját szuppresszálja. Azonban előfordul, hogy az 5' régióhoz, kódoló szekvenciához, vagy éppen gén promóterhez kapcsolódik (31). A szuppresszió mellett, bizonyos körülmények között akár génexpresszió-aktiválást okozó hatását is megfigyelték (32). MiR prekursorok a genom különböző régióiban klaszterekben találhatóak, leggyakrabban intergénikus régiókban és fehérje-kódoló gének intronjaiban. Ritkábban a transzkriptumok exonjaiban és antiszenz transzkriptumokban (33). Régen, ezeket a szakaszokat hívták „junk DNS”-nek.

A mikroRNS-ek nevezéktanát illetően elmondható, hogy a miR előtti három betűs előtag (például: hsa-miR: *Homo sapiens*, cel-miR: *Caenorhabditis elegans*) utal a fajra, amelyben az adott mikroRNS-t leírták. Sorszámmal jelölik az azonos szekvenciájú, azonos lókusztól átíródó mature, azaz érett mikroRNS-t (például miR-125b-1). Amennyiben 1-2 nukleotid eltérés jellemzi a két mikroRNS-t, akkor azt betűvel jelölik (miR-181a, miR-181b). A mikroRNS nevének végén a csillag megjelölés az egyik karról átíródott, kevésbé domináns mikroRNS-t jelöli, a csillag nélküli pedig a túlsúlyban lévő. Az -5p megjelölés a prekursor 5' karjáról kihasításra került mikroRNS, míg a -3p a 3' karról való hasítást jelöli (34).

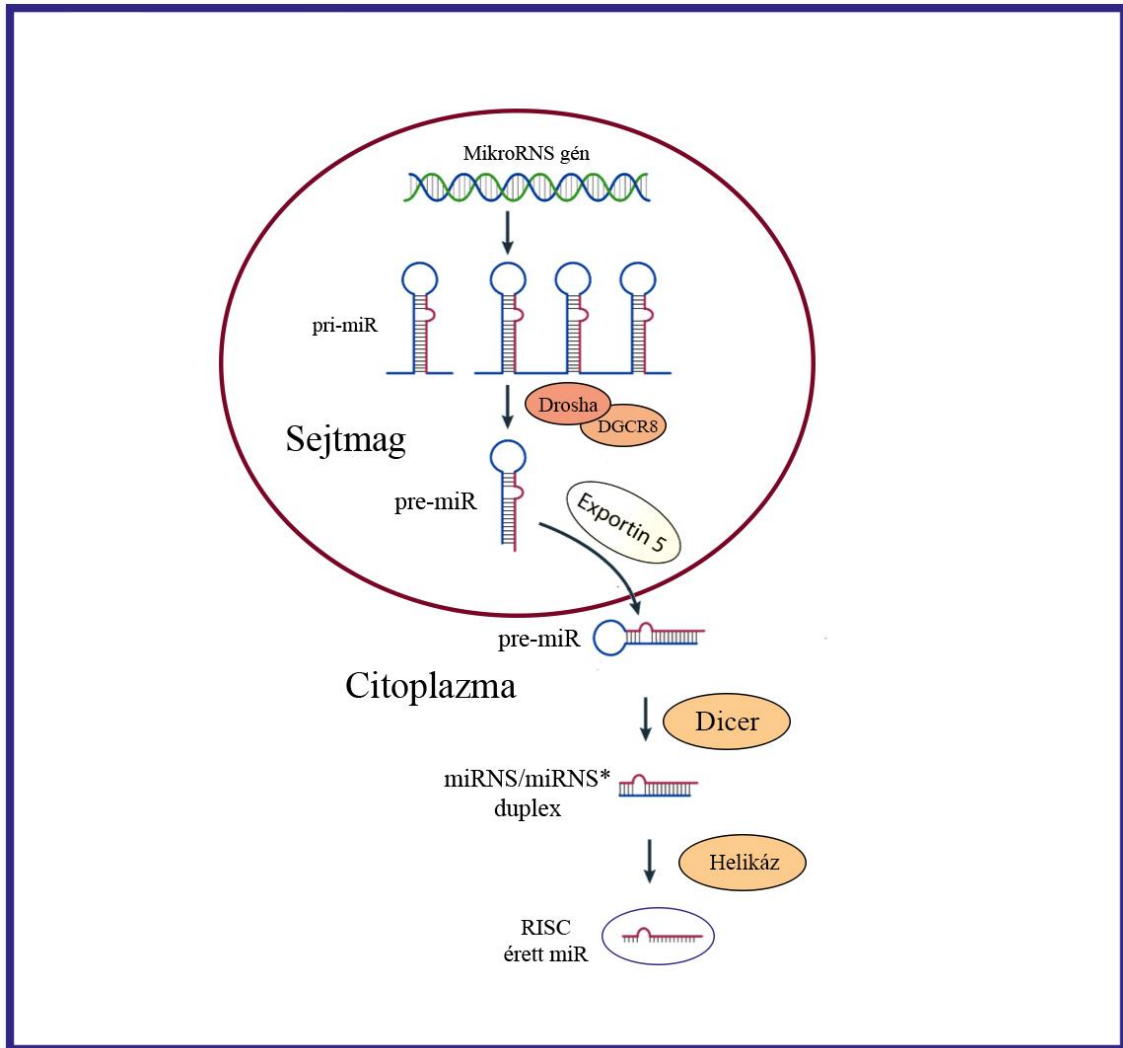
A humán genom 1-5%-t teszik ki a mikroRNS-ek és a fehérje kódoló gének 30%-át szabályozzák (35). Az irodalomban 28 000 feletti a humán rövid RNS szekvenciák száma, ebből azonban az érett mikroRNS-ek száma 2300-ra tehető egy friss kutatás szerint (36).

1.3.1. MikroRNS biogenezis

A mikroRNS-ek RNS polimeráz II segítségével átíródnak a nukleuszban és úgynevezett primer mikroRNS-ek jönnek létre. A pri-mikroRNS-ek néhány százezer nukleotid

hosszúságúak. A mikroprocesszor komplex (endonukleáz hasítását végző Droshából és a duplaszálú RNS kötő DGCR8-ból, azaz DiGeorge syndrome critical region gene 8-ből áll) ezt tovább hasítja egy 70-100 nukleotidnyi hajtű alakú prekursor mikroRNS-é. Majd az exportin-5 és guaninnukleotid-kötő fehérjék a pre-mikroRNS-t a citoplazmába szállítják. Meg kell említeni egy alternatív biogenezist is, mikor közvetlenül az intronokból, spliceoszómák segítségével olvadnak össze és kialakul a mirtron, egy más típusú pre-mikroRNS. Az RNáz III család Dicer enzime hasítja a hajtűnyak tövében a kettős szálú szakaszt és így létrejön egy 1-25 nukleotid hosszúságú miRNS/miRNS* duplex. Előbbi, a mikroRNS stabil érett vezető szála, míg az utóbbi a kísérő szál. Ezt a duplexet helikázok szétválasztják és a RISC-be (RNS-indukálta csendesítő komplex, melyben Dicer, TRBP (transactivation response RNA binding protein) és Ago protein van) bekerül az érett szál, a kísérő szál pedig lebomlik (2. ábra). A mikroRNS a cél mRNS mag régióját ismeri fel, amely 2-8 nukleotid hosszúságú. A cél mRNS és a mikroRNS közti komplementaritás függvénye, hogy endonukleotikus hasítás vagy transzláció gátlás lesz a génszabályozási mechanizmus. Teljes vagy közel teljes komplementaritás esetén endonukleotikus hasítással bomlik a cél mRNS. Ellenkező esetben transzláció gátlás következik be. Az ilyen felhalmozódott, represszált mRNS-ek a P-testekbe (cytoplasmic Processing bodies) kerülnek, amelyek az mRNS lebontási helyei (37-40).

A transzláció gátlás végbemehet slicer-függő és slicer-független módon. Az mRNS endonukleáz hasítását mindkét esetben az Ago2 végzi. A különbség a downstream hatásban van, miszerint bekövetkezhet mRNS degradáció vagy transzláció gátlás. Degradáció esetén a hatás irreverzibilis, vagyis az mRNS bomlása visszafordíthatatlan (39).



1. ábra. MikroRNS biogenezis.

1.3.2. MikroRNS-ek malignitásokban

A mikroRNS-ek metabolikus és jelátviteli útvonalakat is befolyásolhatnak, a sejtproliferáció, differenciáció és a túlélés szabályozásán keresztül (39). Számos tumoros állapotban ismert a mikroRNS expressziós profil diszregulációja (41). A mikroRNS expresszióra jellemző a sejt, illetve szövetspecifitás, így megítélésük, miszerint onkogén vagy tumor szuppresszor egy adott mikroRNS, igen nehézkes. Továbbá nem tudjuk, hogy a megváltozott mikroRNS expresszió a malignus állapot direkt kiváltója vagy indirekt következménye. Tovább nehezíti a helyzetet, hogy egy mikroRNS-nek több targete is lehet és így egy adott mikroRNS adott környezetben onkogén, míg máshol tumor szuppresszor funkciójú (42).

1.4. Cirkuláló mikroRNS-ek

A mikroRNS-ek megtalálhatóak extracellulárisan is, úgy mint a vérplazmában és szérumban, cerebrospinális folyadékban, vizeletben, nyálban, tejben, könnyben, kolosztrumban, hasúri folyadékban, bronhiális lavázsban, szeminális folyadékban és a petefészek tüsző folyadékban (43-49). Az extracelluláris mikroRNS-ek igen stabilak, szobahőmérsékleten akár 4 napig tarthatóak, különböző szélsőséges kondícióknak kitéve sem degradálódnak (45, 50). A mikroRNS-ek extracelluláris vezikulákban vagy proteinekkel együtt, leginkább AGO2-vel találhatóak a testfolyadékokban.

1.4.1. A vérplazma és vészérum eltérő mikroRNS mintázata

A plazma egy sejtmentes felülúszó, amit a vér centrifugálása után kapunk, amely antikoaguláns tartalmazó csőbe vett vérből készül. Szérumot szintén centrifugálás után kapunk, azonban itt a vér antikoaguláns hiányában, magától elkezd alvadni. Az antikoaguláns fajtája is fontos, EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) és citrát megfelelő a későbbi qPCR-hez, azonban a heparin gátolhatja a PCR-t (51).

Egy kutatásban összehasonlították ugyanazon személy szérum és plazma mintáit. A szérumban magasabb RNS koncentrációt mértek, amelynek oka valószínűleg a koagulációs során az RNS felszabadulása a vörösvértestekből. Így tehát a konklúzió az, hogy a koaguláció növelheti a minták közti eltérést. Tehát cirkuláló mikroRNS kutatáshoz a vérplazma javasolt, a szérum kevésbé, a véralvadás folyamata miatt (52).

1.4.2. MicroRNS-ek mint biomarkerek

A likvid biopszia alatt a nem-szolid szövetek biomarker elemzését értjük. Főként vérből történik, ami viszonylag non-invazív nem igényel műtéti mintavételt. Így idő és költséghatékonyabb, mint a hagyományos biopsziás eljárások. A leginkább kutatott non-invazív biomarkerek a cirkuláló tumor sejtek (CTC), a cirkuláló tumor DNS (ctDNA) és az exoszómák (53).

A mikroRNS-ek stabilak a vérben, védve vannak az RN-áz aktivitástól, így jó biomarker jelöltek lehetnek (43, 54).

1.5. MicroRNS-ek a limfopoetikus folyamatokban és limfoid leukémiában

A hematopoezis során a különböző érési folyamatok eredményeképp új, érett vérsejtek képződnek egyetlen progenitor sejtéből, azaz a hematopoetikus őssejtéből. A limfopoezis alatt a B és T sejtek képződését értjük. A B sejt érése a csontvelőben, míg a T sejté a thymusban fejeződik be. Azonban fejlődésüket és aktivációjukat a periférián számos komplex fehérje jelátviteli út befolyásolja, melyeket pedig mikroRNSEk is szabályoznak (55). Az egészséges és malignus hematopoezist számos kutatócsoport vizsgálta, és arra az eredményre jutottak, hogy a mikroRNS-eknek igen fontos szerepük van a folyamat szabályozásában az érési folyamat egésze során (56).

A miR-150 az érett B és T sejtekben is expresszálódik. A limfoid progenitorok expresszálják a miR-150-et ezzel segítve az átalakulást a pro-B-ből pre-B állapotra. A miR-150 targete a c-myc, amely igen fontos transzkripciós faktor a korai limfoid érés során. Ennek elvesztése a B sejtekben azt eredményezi, hogy az érés megáll annál a pontnál amikor pro-B-ből pre-B-vé érne a sejt. Természetesen ezen esetekben a miR-150 felülexpressziója figyelhető meg (57-58).

A miR-181 család hat tagja is fontos szerepet játszik a limfopoezisben. Expressziós szintjét magasnak találták a korai B sejt differenciáció során, majd pedig fokozatos csökkenését írják le (59).

Az ALL szubtypusok elkülönítésére is használható a megváltozott mikroRNS mintázat. Zhang és mtsai a B és T sejt ALL elkülönítésére az alábbi mikroRNS-ek relatív expresszióját javasolják: miR-148, miR-151, miR-424, miR-425-5p, miR-191, miR-146b, miR-128, miR-629 és miR-126 (60).

A kromoszómális eltérések sem maradhatnak ki a mikroRNS kutatások fókuszából ALL esetén. A t(12;21) pozitív ALL-ben például a miR-100-at expresszió növekedését találták jellemzőnek más ALL-formákhoz képest (61).

A B- és T-ALL megkülönböztetésére a miR-148, miR-151 és miR-424-et javasolja Fulci és mtsai (62). Ugyanezen munkacsoport hat mikroRNS (miR425-5p, miR-191, miR-

146b, miR-128, miR-629 és miR-126) expressziójának statisztikai elemzésével tett különbséget különböző B-ALL-ben jellemző eltérések között, úgy mint a t(9;22) vagy a t(1;19) (62). Schotte és mtsai 397 mikroRNS-t vizsgáltak 81 gyermekkori ALL-es csontvelői és perifériás vér mintában, összevetve 17 egészséges gyermek kontroll mintával. Vizsgálatuk eredményeképp egyedi mikroRNS mintázatot tudtak leírni gyermekkori ALL-ben egészséges kontrollokhoz viszonyítva. (63).

A mikroRNS-eket a prognózisra vonatkozóan is vizsgálta számos csoport. A miR-128b diagnóziskori magasabb expressziós szintje jobb prognózissal és jobb prednizolon válasszal társul Nemes és mtsai szerint (64). 147 ALL-es és AML-es beteget vizsgálva a magas miR-24 expresszió rövidebb túléléssel korrelált (65). B- és T-ALL-ben pedig a miR-16 magas expressziója korrelált rövidebb eseménymentes túléléssel (66).

A mikroRNS-ek terápiához kapcsolódó, abban felhasználható lehetséges szerepét is számos kutatás vizsgálja. Akár, glükokortikoid kezelésre való szenzitivitás tekintetében (67), akár tirozin kináz kezelés esetén (68).

1.6. Extracelluláris vezikulák

Az extracelluláris vezikulák kettős foszfolipid membránnal körülvett képletek. Három fő csoportra oszthatóak méretük és keletkezésük alapján: exoszómák, mikrovezikulák és apoptotikus testek. A csoportokra legfontosabb jellemzőit a 2. táblázat részletezi.

2. táblázat. Extracelluláris vezikulák felosztása és legfontosabb jellemzőik

	Exoszóma	Mikrovezikula	Apoptotikus test
Méret	50-100 nm (~vírus)	100-1000 nm (~baktérium)	1-5 µm (~vérlamezke)
Keletkezés	multivezikuláris testek exocitózisa	sejthártya blebbing	apoptózis során
Előfordulás/ Forrás	immunsejtek, tumorok	vérlamezkék, vörösvértestek, endotélsejtek	programozott sejthalál
Tartalom	protein, lipid, mRNS, mikroRNS, DNS, hősokk- fehérjék, enzimek, MHC receptor, tetraspaninok, membrán transzport fehérjék	protein, lipid, mRNS, mikroRNS, snRNS	protein, lipid, DNS

Az extracelluláris vezikulák részt vesznek a sejtek közötti kommunikációban, az angiogenezisben, az intracelluláris komponensek eltávolításában, a szervezet immunválaszában és a véralvadásban is. Működésük lehetővé teszi a fehérjék, RNS-, DNS-sejtek közötti kicserélődését (69). Mind az egészséges, mind pedig a malignus sejtek termelnek vezikulákat (70-71), amelyeket számos testfolyadékból sikerült már kimutatni úgy, mint vér, cerebrospinális folyadék, vizelet, anyatej, de akár a könnyből is (72-73).

1.6.1. Extracelluláris vezikulák hematológiai kórképekben

Extracelluláris vezikulákat vizsgáltak szolid tumoros megbetegedések mellett krónikus limfoid leukémiában is. A vezikulák eredetére vonatkozóan találtak eltérést a betegek

vérplazmájában egészséges kontrollokhoz viszonyítva (74). Ugyanezen kutatás során vizsgálták az anti-CD52 alemtuzumab és az anti-CD20 rituximab elleni rezisztencia kialakulását és írták le a mikrovezikulák lehetséges szerepét (74).

Akut mieloid leukémiában az exoszómákat vizsgálták, és eredményeik alapján feltételezik, hogy a leukémiás sejtek vezikulák révén alakítják a csontvelői környezetet (75-76). Xenograft modell alkalmazásával végzett vizsgálat alapján exoszómális mikroRNS-t javasol MRD követésre AML-ben Hornick és mtsai (77).

1.6.2. Exoszómális mikroRNS-ek

Az exoszómák, melyek legjellemzőbb forrásai az immunsejtek és malignus sejtek, szintén képesek membrán komponensek, proteinek, lipidek, nukleinsavak és mikroRNS-ek transzferére (78-79). Az exoszómák képesek becsomagolni bizonyos mikroRNS-eket, a véráramban megtartani azok integritását (megvédve őket a RNázok hasításától) így azok a sejtek, melyekből származnak, még a véráramban is azonosíthatóak (80-81).

Jelenleg az exoszómális biomarker stratégiák igen nagy népszerűségnek örvendenek, "a kevesebb több" elvet követve. Tehát azt feltételezik, hogy kevés számú vezikuláris mikroRNS igen fontos és specifikus információt hordoz magában adott patológiás állapotra vonatkoztatva. A malignus sejtek viszonylag nagyszámú, specifikus mikroRNS-t juttatnak az extracelluláris térbe, exoszómákba csomagolva, így egy specifikus exoszómális mikroRNS mintázat alakul ki a perifériás vérben, amely akár biomarkerként is használható volna (82).

A tiszta exoszóma izolálás igen időigényes folyamat és számos megerősítő, konfirmáló lépést igényel, amely inkább teszi ezt experimentálissá mintsem a klinikai betegellátásban napi szinten használhatóvá (83). Ezért a munkám során a gold standardnak számító ultracentrifugálással nyerhető exoszóma gazdag frakciót (exosome enriched fraction, EEF) vizsgáltam.

2. Célkitűzések

Célkitűzéseim az alábbiak voltak:

1. Szakirodalmi adatok alapján kiválasztott mikroRNS-ek extracelluláris expressziójának karakterizálása gyermekkori akut limfoblasztos leukémiás betegek perifériás vérében, csontvelőjében és cerebrospinális folyadék mintáiban
2. A vizsgált mikroRNS-ek expressziós változásának értékelése, mint minimális maradék betegség biomarker.

3. Módszerek

3.1. ALL biobank

Mind a mintagyűjtés, mind pedig a kutatás az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével (60106-1/2015/EKU és 6886/2019/EKU számú engedély) és a Helsinkai Nyilatkozatot követve végeztük.

2016-tól kezdve csontvelői, perifériás vér és cerebrospinális folyadék (CSF) mintákat gyűjtünk és tárolunk biobankunkban gyermekkori akut limfoblasztos leukémiás gyermekektől. A betegeket a Heim Pál Gyermekkorház onko-hematológiai osztályán és a Semmelweis Egyetem 2. számú Gyermekgyógyászati Klinikán diagnosztizálják és kezelik.

A vér (3,5 ml) és csontvelői (1 ml) mintákat citrátos csőbe veszik le a nővérek, a gerincvelői folyadék (~1 ml) mintákat pedig natív csövekbe.

A leukémia-gyanús gyermekek kivizsgálása során történt rutin diagnosztikus mintavételek során veszik le a mintákat számunkra is, ezt a továbbiakban 0. napnak nevezem. Amennyiben bebizonyosodik az ALL diagnózis, akkor az ALL-IC BFM 2009 protokoll szerinti indukciós terápia alatt az alábbi időpontokban gyűjtünk további perifériás vérmintát: 8, 9, 15, 29, 30, 33. nap. Csontvelői és CSF mintát pedig a protokoll szerinti 15. és 33. napon.

DNS izolálásra is teszünk el mintát a betegektől, diagnóziskor és remisszióban is, erre EDTA-s csövet használunk, ezek jellemzően csontvelői minták, melyeket -20°C-on tároltuk izolálásig.

3.2. A vizsgált betegpopuláció

Kutatásom során 28 de novo és 5 relabált, továbbá 2 központi idegrendszer érintett (KIR+) prekursor B-sejtes ALL-es beteg mintáit vizsgáltuk. Az 5 relabált beteg első relapszusa alatt történt a mintagyűjtés. A betegek 1-18 éves kor közöttiek, az 1 éves kor alatti betegek kezelési protokollja eltérő, így az ilyen esetek nem vizsgáltuk.

Az első vonalban kezelt ALL-es betegek három alcsoportját vontuk be a vizsgálatokba citogenetikai jellemzőik alapján: hiperdiploid (kromoszómáik száma 47 vagy több), t(12;21)(p13;q22) transzlokációs (más néven ETV6/RUNX1 fúzió) és normál kariotípus alcsoportba. Ez utóbbiba azok a betegek kerültek, akinél nem találtak citogenetikai abnormalitást (akár sikeres volt a kariotipizálás, akár nem), illetve a FISH vizsgálat során (melynél a leggyakoribb ALL-ben jellemző eltéréseket vizsgálják) sem találtak eltérést és diploidnak írta le az áramlási citometriai vizsgálat a DNS indexük alapján. A többi genetikai alcsoportot nem vizsgáltuk.

A relabált betegek kis száma miatt nem soroltam őket külön alcsoportokba citogenetikai jellemzőik tükrében.

Vizsgáltam központi idegrendszer érintett (KIR+) betegek CSF mintáit is. A KIR+ betegek száma igen alacsony, így én két beteg diagnóziskori és 15. napi mintáját vizsgáltam.

Kontroll beteg mintákat is gyűjtöttünk nem ALL-es gyermekektől. Olyan betegeket kiválasztását tűztük ki célul, akiknél semmilyen vérképzőrendszeri betegség nem áll fent, sem olyan kórkép, amely esetén a mikroRNS mintázat átfedhetne a leukémiás betegekével (irodalmi adatokra támaszkodva), mégis történt vérvétel tőlük a SE II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán nem-kutatási célból. Így a kontrol betegeink az alábbi betegségekkel kerültek kivizsgálásra: D vitamin deficiencia, középfülgyulladás, ótvar, hiperthireozis, 1-es típusú neurofibromatosis, vas hiányos anémia és fitymaszkület.

A kemoterápia első hónapja során az alábbi klinikai adatokat gyűjtöttem össze:

- Diagnóziskori fehérvérsejtszám
- Abszolút blaszt szám a 8. napon perifériás vérben
- Csontvelői MRD áramlási citometriával mérve a 15. napon
- Abszolút fehérvérsejtszám a 33. napon
- Abszolút limfocitaszám a 33. napon
- Csontvelői MRD áramlási citometriával mérve a 33. napon

A kutatás során TaqMan Low Density Array (TLDA) kártyákon vizsgáltam a Felfedező populációba tartozó betegek mintáit, majd ezt a populációt kibővítve további mintákkal, létrehoztam az úgynevezett Kibővített populációt. Ezeket a mintákat qPCR-rel vizsgáltam csak úgy, mint az exoszóma gazdag frakciót (EEF).

A mintaszámok és mintatípusok részletezése a 3.-6. táblázatban található.

3. táblázat. A felfedező és kibővített populáció betegadatai

		Felfedező populáció (TLDA)						Kibővített populáció (qPCR)			
Alcsoportok		CsV 0.nap (n)	PV 0.nap (n)	PV 8.nap (n)	PV 33.nap (n)	CSF 0.nap (n)	CSF 15.nap (n)	PV 0.nap (n)	PV 8.nap (n)	PV 15. nap (n)	PV 33.nap (n)
De novo ALL	HD	3	3	3	2			8	8	8	8
	t(12;21)	6	6	3	2			9	9	9	9
	normál	6	6	3	2			10	10	10	9
Relab. ALL		5	5								
KIR ALL						2	2				
Kontroll			10					10			
Összesen		20	30	9	6	2	2	37	27	27	26

Csv: csontvelő, pv: perifériás vér, CSF: gerincvelői folyadék, HD: hiperdiploid, Relab.: relabált ALL, KIR+ ALL: központi idegrendszer érintett ALL (KIR 2, KIR 3)

4. táblázat. A felfedező populáció (TLDA kártyán vizsgált) minták betegadatai

Felfedező populáció alcsoportok		Életkor (év)	Betegszám (n)	Fiú (n)	Lány (n)
De novo ALL	kariotípus: hiperdiploid	3,1 (2,0 – 3,7)	3	1	2
	t(12;21)	3,6 (3,1 – 4,6)	6	3	3
	kariotípus: normál	3,1 (1,5 – 5,3)	6	4	2
Relabált ALL		10,4 (6,3 – 18,8)	5	3	2
KIR+ ALL*		4,6 (0,7-8,4)	2	1	1
Összbetegszám		3,9 (1,5 – 18,8)	22	12	10
Kontroll		4,4 (1,6 – 15,1)	10	6	4

* az egyik beteg KIR 2 a másik KIR 3 volt

5. táblázat. A kibővített populáció qPCR-rel mért mintáinak betegadatai PFP esetén

qPCR alcsoportok		Életkor (év)	Betegszám (n)	Fiú (n)	Lány (n)
De novo ALL	kariotípus: hiperdiploid	3,8 (2,0 - 13,7)	8	1	7
	t(12;21)	3,1 (2,2 - 4,6)	9	6	3
	kariotípus: normál	4,9 (1,5 – 17,3)	11	9	2
Kontroll		4,4 (1,6 – 15,1)	10	6	4

6. táblázat. qPCR-rel mért minták betegadatai exoszóma gazdag frakció esetén

Alcsoport	Életkor (év)	Betegszám (n)	Fiú (n)	Lány (n)
Normál kariotípus	3,5 (1,5-9,7)	5	4	1
t(12;21)	3,3 (2,2-4,6)	8	6	2
Összbetegszám	3,5 (1,5-9,7)	13	10	3
Kontroll	6,4 (1,6-14,4)	6	4	2

3.3. Betegminták - vérlemezke-mentes plazma

Vérlemezke-mentesített plazma (PFP) mintákat használtam a vizsgálataim során. A vérlemezkek igen gazdagok mikroRNS-ekben és a célkitűzésem szerint, a feltehetően leukémiás blasztokból származó mikroRNS-eket vizsgáltam, nem pedig a vérlemezke eredetűeket (84).

Az International Society of Thrombosis and Haemostasis ajánlása (85) alapján a csontvelői és perifériás vérmintákat a levételtől számított 2 órán belül elkezdjük feldolgozni. A feldolgozás során centrifugáljuk a mintákat (2500 rcf, 15 perc, 16°C-on), majd a felülúszót átvisszük egy másik csőbe és újra centrifugáljuk azonos beállítással. Majd a felülúszót kiadagoljuk és felhasználásig -80°C-on tároljuk (85).

Azon CSF mintákat, amiket vizsgálatom során felhasználtam, nem centrifugáltuk, hanem levétel után kiadagoltuk és -80°C-on tároltuk.

A csontvelőből sejteket is izolálunk és tárolunk biobankunkban. Melynek részletes leírásától eltekintek, mert kutatásom során nem vizsgáltam sejteket.

3.4. RNS izolálás és cDNS szintézis

MiRNeasy serum/plasma kittel (Qiagen, Hilden, Németország) izoláltam RNS-t a kiolvasztott PFP mintákból. 100µl plazma mintából, ill. CSF-ből indultam ki az izolálásnál, a szintetikus spike-in cel-miR-39-et pedig az izolálás 2. lépéseként, a lízis puffer hozzáadása után adtam az egyes mintákhoz. Az RNáz inhibitort az izolálás legvégén adtam hozzá a 14 µl RNáz-mentes vízbe felvett mintához vagy a cDNS átírás legelső lépéseként. Az átíráshoz a TaqMan Advanced miRNA cDNS Synthesis Kitet (Thermo Fischer Scientific, Waltman, MA, USA) használtam, követve a gyártó protokollját.

3.5. Exoszóma gazdag frakció

Az exoszóma gazdag frakciót ultracentrifugálással izoláltam Beckman Coulter Optima XP ultracentrifugával. 13 beteg összesen 52 perifériás vér PFP mintáját használva (6. táblázat). Ultracentrifugáláshoz 500 µl kiolvasztott PFP mintából indultam ki. Először

500 rcf-n centrifugáltam 5 percig, sejtméntesítés céljából, majd a felülúszót 12 500 g-n 20 percig centrifugáltam mikrovezikula-mentesítés céljából. A felülúszót PBS-sel felöntve pedig 100 000 g-n 70 percig ultracentrifugáltam, a felülúszót elöntöttem és a pelletet újra PBS-sel, az előbbivel megegyező beállításokkal ultracentrifugáltam. A pelletet végül az miRNeasy serum/plasma kit lízis pufferébe vettem fel, majd -80°C-on tároltam további feldolgozásig, mely teljes egészében megegyezett a PFP RNS izolálásával, cDNS átírásával, qPCR mérésével.

3.6. MikroRNS profil egyedi TLDA mikrofluidikus kártyán

QuantStudio 7 Flex műszert használtam a TaqMan Low Density Array kártyákra feltett minták mikroRNS expressziójának mérésére a SE II. Belgyógyászati Klinika, Endokrinológiai genetikai laboratóriumában. Minden esetben 5,5 µl amplifikált cDNS-ből indultam ki és követtem a gyártó előírását a mérés során. A vizsgált 46 mikroRNS a 7. táblázatban található, kutatási terület és a hivatkozás megjelenítésével. Csak olyan mikroRNS került kiválasztásra, amelyik leukémiás blasztokban felülexpresszált és legalább 2 különböző publikációban szerepelt.

7. táblázat. A TLDA kártyára irodalmi adatok alapján kiválasztott mikroRNS-ek referenciái és hozzá tartozó kutatási terület

MikroRNS	Kutatási terület	Referencia
cel-miR-39	Exogén, spike-in kontrol	(86) (87)
miR-103a-3p, miR-638 miR-484, miR-30d-5p, miR-16-5p	Referencia mikroRNS-ek	(88-90)
let-7a-5p, let-7f-5p	Vérlemezke eredetű mikroRNS-ek	(91)
miR-128-3p, miR-181b-5p	Csontvelői eredetű mikroRNS-ek	(92-93)
miR-222-3p, miR-223-3p, miR-361-3p, miR-374a-5p, miR-501-5p, miR-511-5p, miR-532-5p, miR-660-5p, miR-98-5p	Hiperdiploid ALL-ben leírt mikroRNS-ek	(63)
miR-20a-5p, miR-93-5p	ALL sejtvonalakban leírt mikroRNS-ek	(94)
miR-100-5p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-320a, miR-383-5p, miR-494-3p, miR-629-5p, miR-99a-5p	t(12;21) ALL-ben leírt mikroRNS-ek	(63, 88, 93, 95)
miR-17-5p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-181c-5p, miR-320a, miR-342-3p, miR-106a-5p, miR-1290	Recidivált ALL-ben leírt mikroRNS-ek	(92-93, 95-97)
miR-146a-5p, miR-155-5p, miR-222-3p, miR-34a-5p, miR-511-5p, miR-99a-5p	Pre B-ALL-ben leírt keringő mikroRNS-ek	(88)
miR-632, miR-654-5p	T és dendritikus sejtvonalakban leírt mikroRNS-ek	(98)

3.7. Kvantitatív PCR

A TLDA kártyán lemért 46 mikroRNS expresszióját vizsgálva kiválasztottam négyet (miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-128-3p és miR-222-3p), melyek expresszióját bővített populáción qPCR technikával is lemértem. Ehhez a TaqMan Advanced miRNA assay-
ket (Thermo Fischer Scientific, Waltman, Ma, USA) használtam. Összesen 28 beteg 110 perifériás vér PFP mintáján mértem le a 4 kandidáns mikroRNS-t plusz a miR-484 normalizáló mikroRNS-t duplikátumban.

Az exoszóma gazdag frakció 52 mintájának miR-128-3p és miR-222-3p expresszióját szintén qPCR-rel vizsgáltam, duplikátumban, plusz a miR-16-5p normalizálót mikroRNS-t.

Minden minta esetén mértem a spike-in cel-mir-39 expresszióját is.

3.8. Statisztikai elemzés

Az elemzést R statisztikai szoftver (R Foundation for Statistical Computing, Bécs, Ausztria, 3.5.1 verzió) segítségével Dr. Gézsi András végezte.

A megfelelő normalizáló mikroRNS kiválasztásához a NormqPCR csomagból a geNorm és NormFinder algoritmusokat használta. A Limma csomag segítségével állapította meg a statisztikailag szignifikáns mikroRNS expressziós különbségeket. Ennek során lineáris modell illesztést alkalmazott minden egyes mikroRNS génre a páciensek csoportbesorolása, illetve a különböző mintavételi időpontok alapján. A nemet, mint koefficienszt használta a modellekben. Ezt követően kiszámította a mikroRNS-ekre vonatkozó moderált t-statisztikát és a differenciális expresszió log-odds-át egy empirikus bayesi módszerrel, melynek során a standard hibákat egy közös érték felé mozdítjuk el. Az így kapott p-értékeket a Benjamini-Hochberg többszörös hipotézistesztelési korrekciós módszerrel adjusztálta. Azokat a mikroRNS-eket tekintettük differenciálisan expresszálódónak, amelyek esetén a korrigált p-érték kisebb volt, mint 0,05.

Pearson korrelációt számolt az áramlási citometria MRD eredménye és az adott mikroRNS log₂ alapú transzformált expressziós szintje illetve az expressziós változási értékei közt. A kapott p-értékeket adjusztáltuk a Benjamini-Hochberg módszerrel, 0,05 szignifikanciaszint (1-es típusú hiba) használatával.

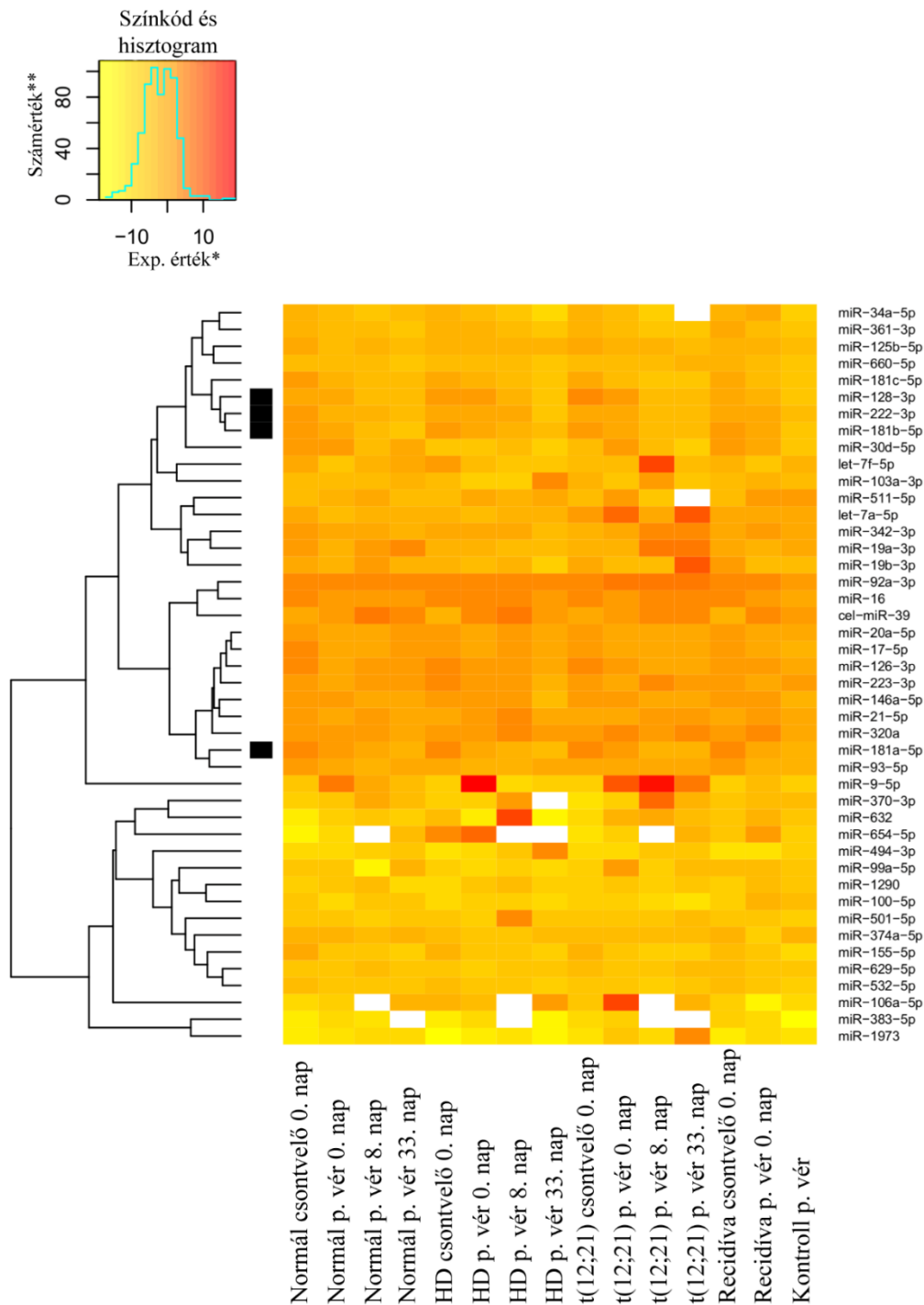
4. Eredmények

4.1. A felfedező populáció mikroRNS expressziós mintázata TLDA kártyán

46 miR expresszióját vizsgáltam TLDA kártyán ALL-es betegek perifériás vér és csontvelői PFP továbbá CSF és egészséges kontroll perifériás vér PFP mintáiban.

Az 2. ábra hő térképe szemlélteti a csontvelői és perifériás vér illetve a kontroll PFP mintákban mért expressziós szintet. A CSF minták nem szerepelnek az ábrán, mert azon minták esetén más normalizáló mikroRNS-t használtam.

Nem találtunk szignifikáns korrelációt a perifériás vér és csontvelő PFP mikroRNS mintázata között.



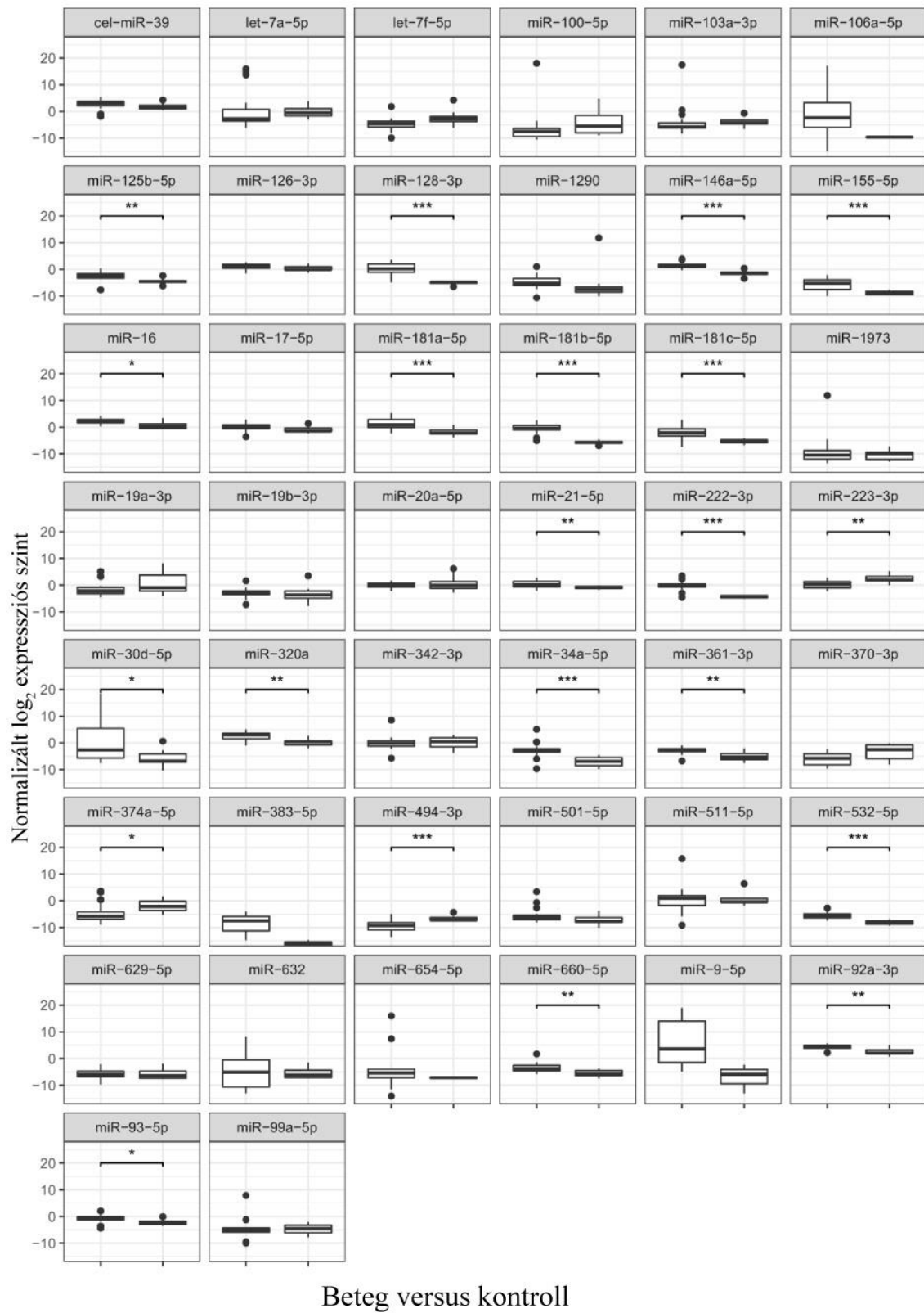
2. ábra. TaqMan Low Density kártyán mért normalizált log₂ transzformált expressziós szintek perifériás vér és csontvelői PFP-ben ALL alcsoportokban és kontroll betegekben. A hisztogram megmutatja, hogy a heatmap-en hány olyan cella van amely az x tengelyen feltüntetett tartományba esik. A sárga szín alulexpresszálságot, míg a piros felülexpresszáldást jelent a normalizáló mikroRNS-hez képest. A bal oldalon

található fekete jelölések a qPCR vizsgálatra kiválasztott mikroRNS-eket jelölik. *log2 transzformált expresszió érték **hisztogram magassága

A 3. ábra mutatja be a perifériás vér PFP mikroRNS expresszióját de novo és relabált betegek esetén egészséges kontrollokkal összehasonlítva. Összesen 21 mikroRNS esetén mutattunk ki szignifikáns eltérést. A relabált betegeket kivonva az elemzésből (kis elemszám, rövid követési idő és eltérő kezelési protokoll miatt), a de novo ALL diagnóziskori perifériás vér PFP mikroRNS mintázata egészséges kontroll perifériás vérhez hasonlítva 19 mikroRNS esetén mutatott szignifikáns különbséget. 18 mikroRNS expressziója szignifikánsabb magasabb, míg egy mikroRNS-é szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult.

Vizsgáltuk a három kariotípus csoportot is külön, szintén egészséges kontroll perifériás vér PFP-hez hasonlítva, és 5 mikroRNS egységesen mindhárom csoportba (hiperdiploid, t(12;21) és normál kariotípus csoport) felülexpresszálnak: miR-128-3p, miR-146a-5p, miR-181b-5p, miR-222-3p és a miR-532-5p. Nem találtuk egyedi mikroRNS mintázatot egyik alcsoportban sem.

Az összes de novo ALL-es perifériás vér PFP-t vizsgálva a diagnózis és a kezelés 33. napja között az alábbi 4 mikroRNS expressziója volt szignifikánsan magasabb a kontrollokhöz viszonyítva: miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-81b-5p, miR-222-3p. Így a bővített populáción qPCR-rel ezt a 4 mikroRNS-t vizsgáltam tovább.



3. ábra. A miR expresszió ALL-es perifériás vér PFP mintában és kontroll vér PFP-ben TLDA kártyán vizsgálva. A beteg minták diagnóziskori de novo és relabált ALL minták. A kontroll nem ALL-es gyermekek perifériás vér PFP mintájában mért miR expresszió. A boxok a 2. és 3. kvartilist jelölik, a boxon belüli vastag vízszintes vonal a mediánt, az alsó függőleges vonal a minimum értéket, amennyiben nincsen alsó kiugró érték, a felső függőleges vonal a maximum értéket, amennyiben nincsen felső kiugró érték vagy a $Q3+1,5 \cdot IQR$. A pontok a szélsőértékeket, a boxok feletti vonalak pedig a szignifikáns korrelációt jelölik, ahol $p < 0,05$. *** esetén a $p: 0-0,001$; ** esetén $p: 0,001-0,01$; * esetén $p: 0,001-0,05$.

Két betegnek volt központi idegrendszeri érintettsége, a betegek diagnóziskori és 15. napi CSF mintáit vizsgáltam TLDA kártyán. A legstabilabban expresszáldó mikroRNS ezen minták és a perifériás vér PFP esetén a miR-532-5p volt, így ezt használtam normalizálónak. A vizsgálatot elvégeztem a perifériás vér és csontvelői PFP méréseknél alkalmazott miR-484 normalizálót használva is. Szignifikáns eredményt egyik normalizálóval való számolás eredményeképp sem kaptam a miR-128-3p és miR-222-3p esetén (8. táblázat).

8. táblázat. MikroRNS expresszió csökkenés a 15. napra CSF mintákban TLDA kártyán mérve, 2 központi idegrendszer érintett betegnél. (Egyed B. et al. 2020-additional File 1, Table S4)

Vizsgált mikroRNS	Log FC	p érték	Adjusztált p érték
miR-128-3p	-6,97	0,06	0,22
miR-222-3p	-5,66	0,11	0,22

4.2. MikroRNS expresszió kibővített populáción qPCR módszerrel vizsgálva

Kibővített populáción (28 beteg) qPCR módszerrel vizsgáltam 4 mikroRNS expresszióját de novo ALL-es betegek perifériás vér PFP-jében az indukciós terápia első hónapja során, 4 mintavételi időpontban.

Minden mérést duplikátumba végeztem, az ezek közti korreláció: Pearson's $r = 0,998$, $p = 2,2 \cdot 10^{-16}$. A TLDA és qPCR mérések közti korreláció esetén Pearson's $r = 0,873$, $p = 3,19 \cdot 10^{-44}$.

Az életkort, mint független változót vizsgálva a teljes ALL csoportban sem találtam szignifikáns kapcsolatot az expressziós változásokkal.

4.2.1. Diagnóziskori de novo ALL perifériás vér PFP mikroRNS expressziója kontroll perifériás vér PFP-hez viszonyítva

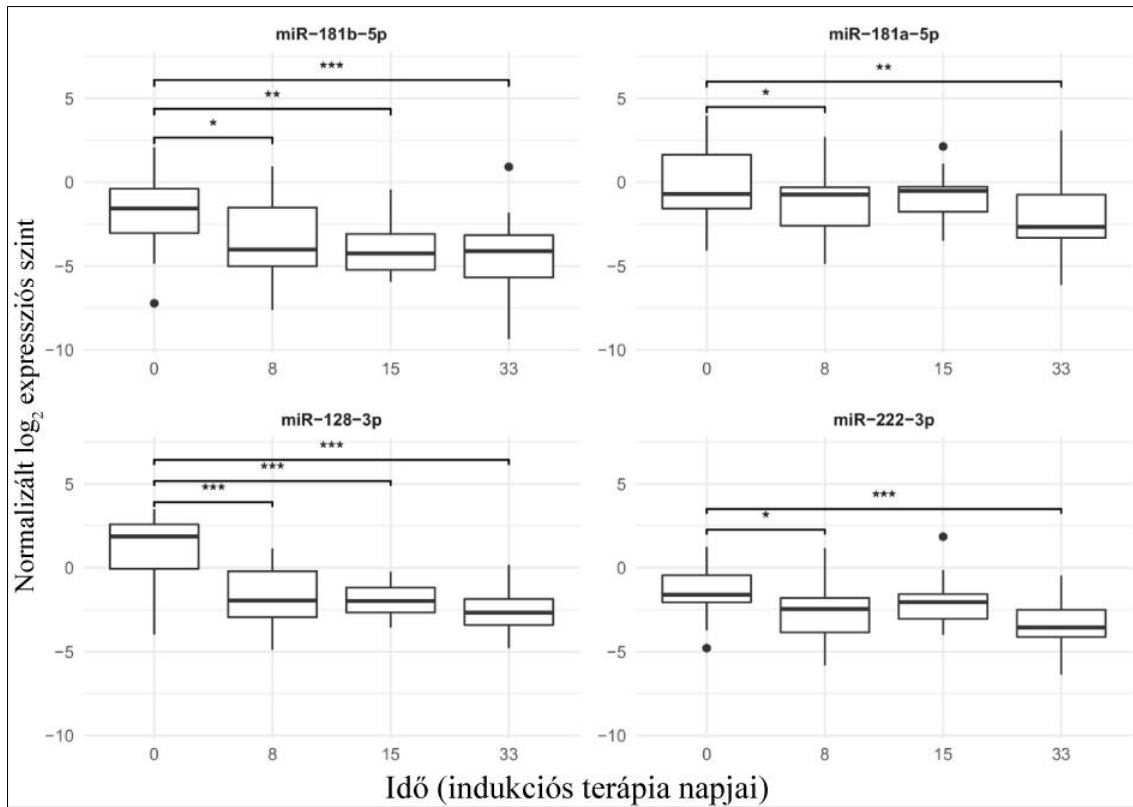
A három kariotípus csoportból kettő esetén, a t(12;21) és normál csoportban azt találtam, hogy mind a négy mikroRNS expressziója szignifikánsan különbözik a nem leukémiás kontrolloktól. A harmadik csoportban, a hiperdiploid betegek esetén csak a miR-128-3p és miR-222-3p esetén mutatkozott szignifikáns eltérés a kontrollokhoz viszonyítva. Azonban a teljes ALL csoportot vizsgálva (mindhárom kariotípus csoportot egyesítve) mind a négy vizsgált mikroRNS diagnóziskori expressziója szignifikánsan eltért a nem leukémiás kontroll perifériás vér PFP-hez hasonlóan. A log fold change értékek 9. táblázatban láthatóak.

9. táblázat. Diagnóziskor de novo ALL perifériás vér PFP mikroRNS expressziója egészséges kontrollokhoz viszonyítva. NS: nem szignifikáns

Alcsoportok	miR-128-3p log ₂ FC (adj. p érték)	miR-181a-5p log ₂ FC (adj. p érték)	miR-181b-5p log ₂ FC (adj. p érték)	miR-222-3p log ₂ FC (adj. p érték)
Hiperdiploid kariotípus	3,39 (7,05*10 ⁻⁴)	NS	NS	2,09 (4,06*10 ⁻²)
t(12;21) kariotípus	5,93 (9,59*10 ⁻¹⁰)	2,56 (1,38*10 ⁻²)	3,84 (2,26*10 ⁻⁴)	3,34 (2,21*10 ⁻⁴)
Normál kariotípus	4,23 (1,78*10 ⁻⁵)	3,45 (5,35*10 ⁻⁴)	4,31 (4,73*10 ⁻⁵)	2,63 (4,76*10 ⁻³)
Teljes ALL csoport	4,52 (3,48*10 ⁻⁹)	2,46 (2,11*10 ⁻³)	3,46 (4,73*10 ⁻⁵)	2,68 (2,15*10 ⁻⁴)

4.2.2. Az indukciós terápia alatti mikroRNS expressziós szint változások a teljes ALL csoportban

Az indukciós kezelés első hónapja során 4 mintavételi időpontban vizsgáltam a mikroRNS expressziót. A 4. ábrán látható a vizsgált mikroRNS-ek expressziója (normalizált, log₂ expressziós szint) és a mintavételi időpontok közti szignifikáns korreláció. A hozzájuk tartozó számadatokat a 10. táblázat tartalmazza. A miR-181b-5p és miR-128-3p expressziós mintázata mutat hasonló képet, csak úgy, mint a miR-181a-5p és a miR-222-3p. A kezelés megkezdése után mindegyik mikroRNS szintje szignifikáns csökkenést mutatott a 8. illetve a 33. napra. Tehát folyamatos csökkenést nem detektáltam a vizsgált négy időpontban.



4. ábra. Az indukció terápia alatti mikroRNS szintek perifériás vér PFP-ben mérve.

A boxok a 2. és 3. kvartilist jelölik, a boxon belüli vastag vízszintes vonal a mediánt, az alsó függőleges vonal a minimum értéket, amennyiben nincsen alsó kiugró érték, a felső függőleges vonal a maximum értéket, amennyiben nincsen felső kiugró érték vagy a $Q3 + 1,5 \cdot IQR$. A pontok a szélsőértékeket, a boxok feletti vonalak pedig a szignifikáns korrelációt jelölik, ahol $p < 0,05$. *** esetén a $p: 0-0,001$; ** esetén $p: 0,001-0,01$; * esetén $p: 0,001-0,05$.

10. táblázat. Az indukciós terápia alatti mikroRNS expresszió csökkenés a teljes ALL csoportban a perifériás vér PFP-ben mérve. NS: nem szignifikáns

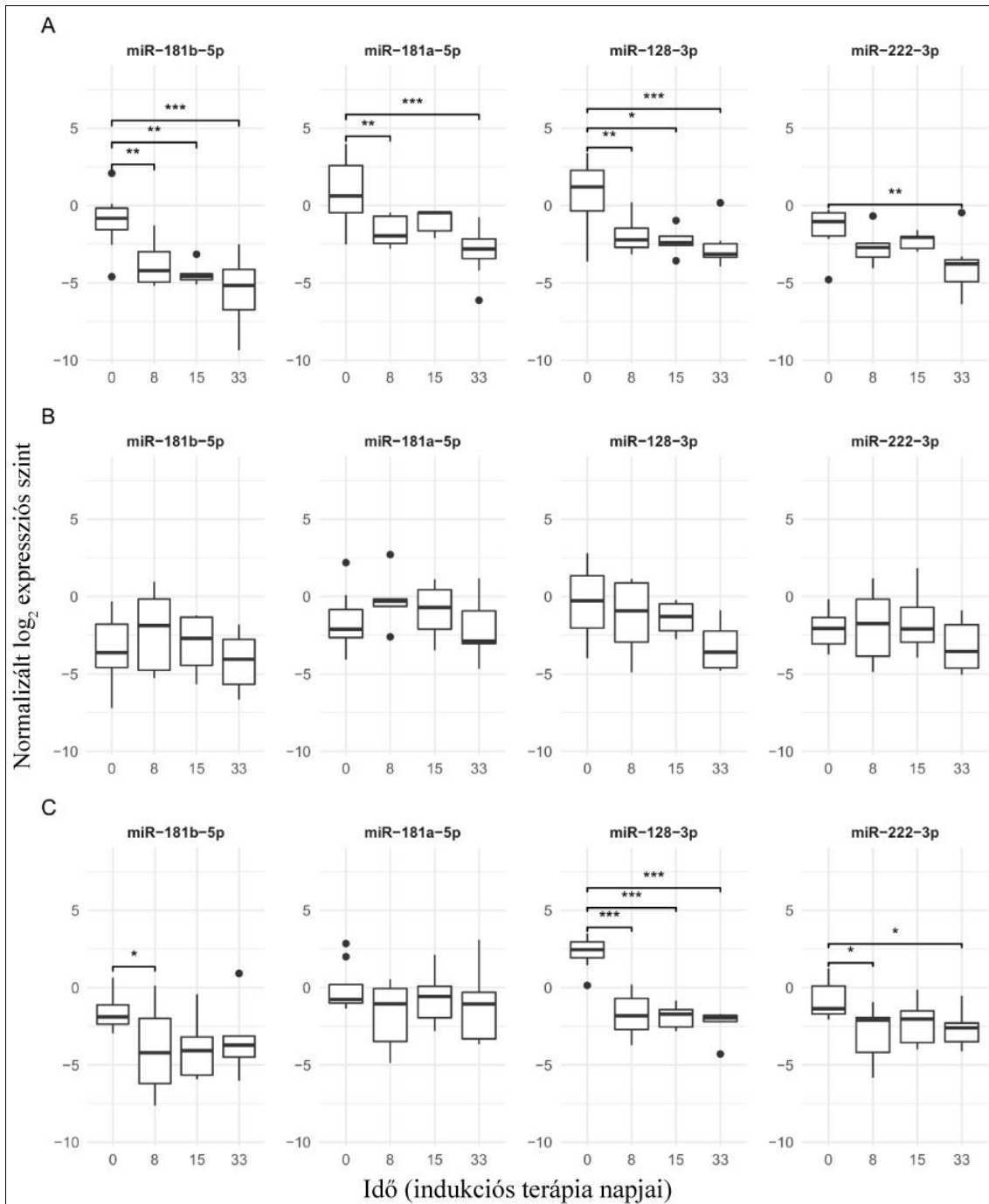
mikroRNS	mikroRNS expressziós változás a különböző mintavételi időpontok között log ₂ FC (adjusztált p érték)		
	8. nap – 0. nap	15. nap - 0. nap	33. nap - 0. nap
miR-128-3p	-2,86 (3,6*10 ⁻⁷)	-3,15 (3,87*10 ⁻⁷)	-3,60 (7,77*10 ⁻¹⁰)
miR-181a-5p	-1,33 (3,12*10 ⁻²)	-0,93 (NS)	-2,08 (1,01*10 ⁻³)
miR-181b-5p	-1,75 (1,48*10 ⁻²)	-2,39 (2,05*10 ⁻³)	-2,76 (8,78*10 ⁻⁵)
miR-222-3p	-1,25 (1,66*10 ⁻²)	-1,03 (NS)	-1,94 (2,09*10 ⁻⁴)

4.2.3. Az indukciós terápia alatti mikroRNS expressziós szint változások alcsoportokban vizsgálva

Az 5. ábra szemlélteti, míg a 11. táblázat bemutatja a számszerű értékeket (normalizált \log_2 expressziós szint) a citogenetikai alcsoportok indukciós terápia első 33 napja alatti mikroRNS expressziós szintekre vonatkozóan. A legtöbb szignifikáns expressziós szint változást a normál kariotípus csoportban figyeltem meg. Itt mind a négy mikroRNS esetén a diagnóziskori és a 33. napi expresszió között szignifikáns csökkenést láthatunk. Három mikroRNS esetén pedig a 8. napra is szignifikáns az expresszió csökkenés.

A hiperdiploid csoportban sehol sem tudtam statisztikailag szignifikáns expressziós változást kimutatni.

A harmadik, t(12;21) alcsoportban a miR-128-3p a diagnózishoz viszonyítva minden mintavételi időpontban szignifikáns csökkenést mutatott. A miR-222-3p szintje mind a 8; mind pedig a 33. napra szignifikánsan csökkent. A miR-181b-5p esetén csökkenést csak a 8. napra figyelhetünk meg.



5. ábra. Az alsocsoportban vizsgált mikroRNS expresszió az indukciós terápia első hónapjában perifériás vér PFP-ben mérve. A: normál kariotípus csoport, B: t(12;21) kariotípus csoport, C: hiperdiploid kariotípus csoport. A boxok a 2. és 3. kvartilist jelölik, a boxon belüli vastag vízszintes vonal a mediánt, az alsó függőleges a minimum értéket, amennyiben nincsen alsó kiugró érték, a felső függőleges vonal a maximum értéket, amennyiben nincsen felső kiugró érték vagy a $Q3 + 1,5 \cdot IQR$. A pontok a szélsőértékeket,

a boxok feletti vonalak a szignifikáns korrelációt jelölik, ahol $p < 0,05$. *** esetén a $p: 0-0,001$; ** esetén $p: 0,001-0,01$; * esetén $p: 0,001-0,05$.

11. táblázat. Az indukciós terápia alatti mikroRNS szintek expressziós változásai perifériás vér PFP-ben mérve különböző alcsoportok esetén. NS: nem szignifikáns.

Alcsoportok	mikroRNS	log ₂ FC (adjusztált p érték)		
		8. nap – 0. nap	15. nap - 0. nap	33. nap - 0. nap
Normál kariotípus	miR-128-3p	-2,49 (2,87*10 ⁻³)	-2,29 (3,09*10 ⁻²)	-2,99 (4,15*10 ⁻⁴)
	miR-181a-5p	-2,58 (2,87*10 ⁻³)	-1,79 (NS)	-3,82 (1,16*10 ⁻⁵)
	miR-181b-5p	-2,72 (2,87*10 ⁻³)	-3,44 (1,51*10 ⁻³)	-4,50 (7,63*10 ⁻⁷)
	miR-222-3p	-1,23 (NS)	-0,98 (NS)	-2,45 (2,41*10 ⁻³)
t(12;21) kariotípus	miR-128-3p	-4,33 (2,20*10 ⁻⁸)	-4,62 (1,74*10 ⁻⁸)	-4,42 (2,12*10 ⁻⁸)
	miR-181a-5p	-1,72 (NS)	-0,71 (NS)	-1,13 (NS)
	miR-181b-5p	-2,49 (4,11*10 ⁻²)	-2,42 (NS)	-2,02 (NS)
	miR-222-3p	-2,15 (1,16*10 ⁻²)	-1,59 (NS)	-1,82 (3,39*10 ⁻²)
Hiperdiploid kariotípus	miR-128-3p	-1,39 (NS)	-2,21 (NS)	-3,31 (NS)
	miR-181a-5p	-1,16 (NS)	-0,16 (NS)	-1,01 (NS)
	miR-181b-5p	0,82 (NS)	-0,98 (NS)	-1,42 (NS)
	miR-222-3p	0,08 (NS)	-0,20 (NS)	-1,47 (NS)

4.3. MikroRNS expressziós szintváltozás korrelációja MRD-vel és egyéb prognosztikai faktorokkal

4.3.1. A teljes ALL populáció mikroRNS expressziós változása MRD-vel és egyéb prognosztikai faktorokkal korreláltatva

A három citogenetikai alcsoportot egyesítve, azaz a teljes ALL csoportra jellemző perifériás vér PFP mikroRNS expressziót és annak változásait és a 15. napi csontvelői áramlási citometriás MRD-t (12. táblázat) illetve egyéb prognosztikai faktorokat korreláltattuk.

Két mikroRNS esetén a 8. napra való expresszió szignifikánsan korrelált a 15. napi áramlási citometriával mért MRD-vel. A másik két vizsgált mikroRNS esetében illetve 0-15. nap vonatkozásában nem szignifikáns a korreláció (12. Táblázat).

12. táblázat. 15. napi áramlási citometriás MRD és a 0-8. nap ill., 0-15 nap közti mikroRNS expressziós változás korrelációja.

mikroRNS	Mintavételi időpontok	Fold change**	Pearson r	Adjusztált p érték
miR-128-3p*	8-0. nap*	0,11	0,88	$2,71 \cdot 10^{-4}$
miR-222-3p*	8-0. nap*	0,27	0,81	$3,00 \cdot 10^{-3}$
miR-181a-5p	8-0. nap	0,23	0,58	0,15
miR-222-3p	15-0. nap	0,47	0,64	0,15
miR-128-3p	15-0. nap	0,15	0,64	0,20
miR-181b-5p	8-0. nap	0,09	0,31	0,74
miR-181b-5p	15-0. nap	0,16	-0,08	0,96
miR-181a-5p	15-0. nap	0,62	0,06	0,97

* statisztikailag szignifikáns értékek jelöli ($p < 0,05$) ** mikroRNS expresszió mediánja

A 13. táblázat a 8. napi abszolút blaszt szám perifériás vérben és a 0-8. nap közötti mikroRNS expresszió kapcsolatát mutatja, ahol is egyetlen mikroRNS esetén sem volt szignifikáns korreláció.

13. táblázat. Korreláció a 8. napi abszolút perifériás blaszt szám közt és a perifériás vér PFP mikroRNS expresszió 0. és 8. nap közti csökkenése között a teljes ALL csoporton elemezve

mikroRNS	Fold change	Pearson r	Adjusztált p érték
miR-128-3p	0,11	0,37	0,65
miR-222-3p	0,27	0,16	0,92
miR-181b-5p	0,09	-0,11	0,94
miR-181a-5p	0,23	-0,03	0,99

A 14. táblázat eredményei a 33. napi perifériás vérben mért abszolút limfocitaszámot és a különböző mintavételi időpontok közti mikroRNS expressziós változás közti korrelációt részletezi. Ebben az esetben sem tudtam statisztikailag szignifikáns korrelációt megállapítani.

14. táblázat. A 33. napi perifériás vér abszolút limfocitaszáma és a mikroRNS expresszió változás korrelációja 3 mintavételi időpont és a diagnóziskori perifériás vér PFP-ben.

mikroRNS	Mintavételi időpontok	Fold change*	Pearson r	Adjusztált p érték
miR-128-3p	33-0. nap	0,05	0,61	0,21
miR-222-3p	15-0. nap	0,47	0,59	0,31
miR-128-3p	15-0. nap	0,15	0,54	0,42
miR-181a-5p	15-0. nap	0,62	0,42	0,65
miR-128-3p	8-0. nap	0,11	0,38	0,65
miR-181a-5p	33-0. nap	0,20	-0,22	0,88
miR-181b-5p	33-0. nap	0,08	-0,15	0,93
miR-181b-5p	8-0. nap	0,09	-0,12	0,94
miR-181b-5p	15-0. nap	0,16	0,13	0,94
miR-222-3p	8-0. nap	0,27	0,11	0,94
miR-181a-5p	8-0. nap	0,23	0,07	0,96
miR-222-3p	33-0. nap	0,24	-0,05	0,96

* mikroRNS expresszió mediánja

Továbbá a 33. napi perifériás vér fehérvérsejtszám sem korrelált szignifikánsan a vizsgált mintavételi időpontokban mért mikroRNS expressziós szint változásokkal.

A diagnóziskori, 8., 15., és 33. napon mért expressziós szintet is vizsgáltam a fenti független változókkal, azonban szignifikáns kapcsolatot nem találtam közöttük.

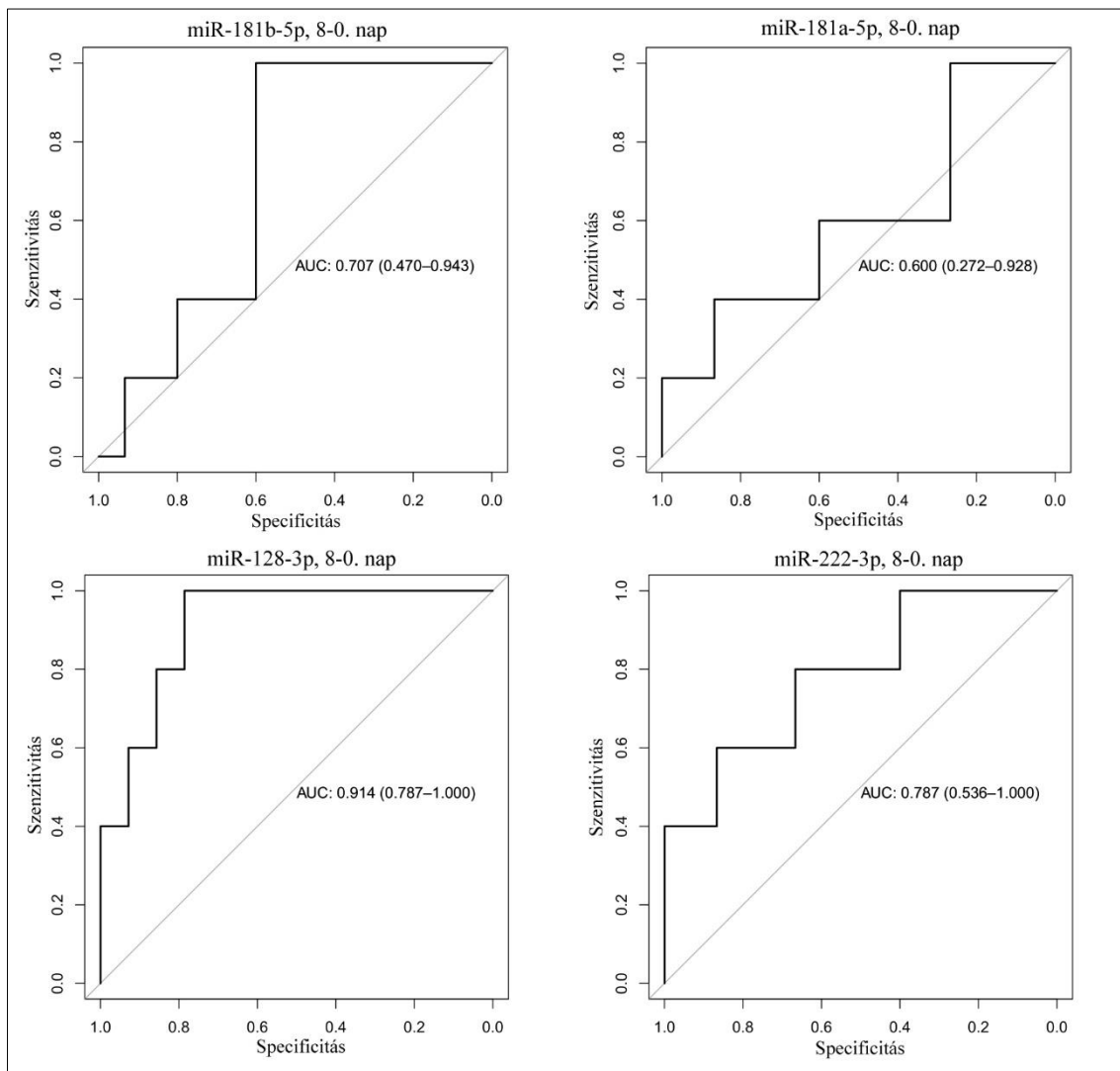
4.3.2. ALL alcsoportok mikroRNS expressziós változása az MRD-vel és egyéb prognosztikai faktorokkal korreláltatva

Mind a három alcsoportban vizsgáltam a 15. napi áramlási citometriával mért MRD, a 8. napi abszolút blaszt szám, a 33. napi abszolút limfocitaszám, és az életkor, mint független változó kapcsolatát a 4 mikroRNS expressziójával és expressziós szint változásával. Az 15. táblázat a szignifikáns korrelációkat mutatja be.

15. táblázat. MikroRNS expressziós változás, az MRD és egyéb prognosztikai paraméterek szignifikáns korrelációja a vizsgált citogenetikai alcsoportokban.

mikroRNS	Mintavételi időpontok	Fold change	Független változó	Beteg alcsoport	Pearson r	Adjusztált p érték
miR-128-3p	8-0. nap	0,15	15. napi MRD	Normál kariotípus	0,99	$7,53 \cdot 10^{-4}$
miR-222-3p	8-0. nap	0,27	15. napi MRD	Normál kariotípus	0,97	$2,74 \cdot 10^{-2}$
miR-222-3p	8-0. nap	0,19	8. napi absz. blaszt szám (perif.)	t(12;21)	0,96	$4,63 \cdot 10^{-2}$
miR-181b-5p	33-0.nap	0,06	33. napi absz. limfocita szám	Normál kariotípus	0,95	$2,98 \cdot 10^{-2}$
miR-222-3p	33-0. nap	0,16	33. napi absz. limfocita szám	Normál kariotípus	0,94	$3,87 \cdot 10^{-2}$

Annak vizsgálatára, hogy az adott mikroRNS expressziós változás mennyire pontosan tudja megjósolni, hogy a beteg alacsony (15. napi FC MRD<1%) vagy magas (MRD>1%) MRD csoportba tartozik, ROC analízist végeztünk. A négy mikroRNS esetén az 6. ábra mutatja be az eredményeket feltüntetve az AUC értéket is. A legmagasabb AUC értéket a miR-128-3p esetén kaptam (AUC=0,91), míg a miR-222-3p esetében AUC szintén magas volt, 0,79.

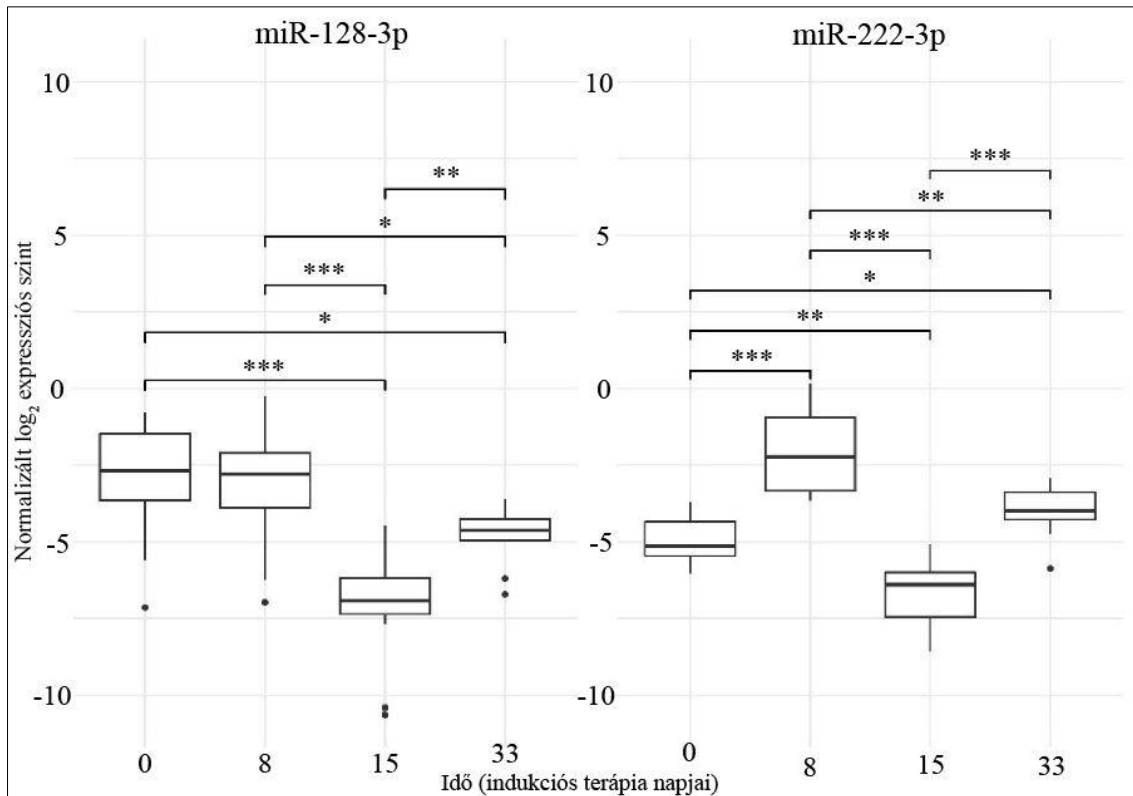


6. ábra. A diagnóziskori és 8. napi mikroRNS expressziós szint változás ROC analízise alacsony és magas MRD esetén.

4.4. Az exoszóma gazdag frakció és PFP miR-128-3p és miR-222-3p expressziós mintázata perifériás vérből ultracentrifugálással izolált mintákon

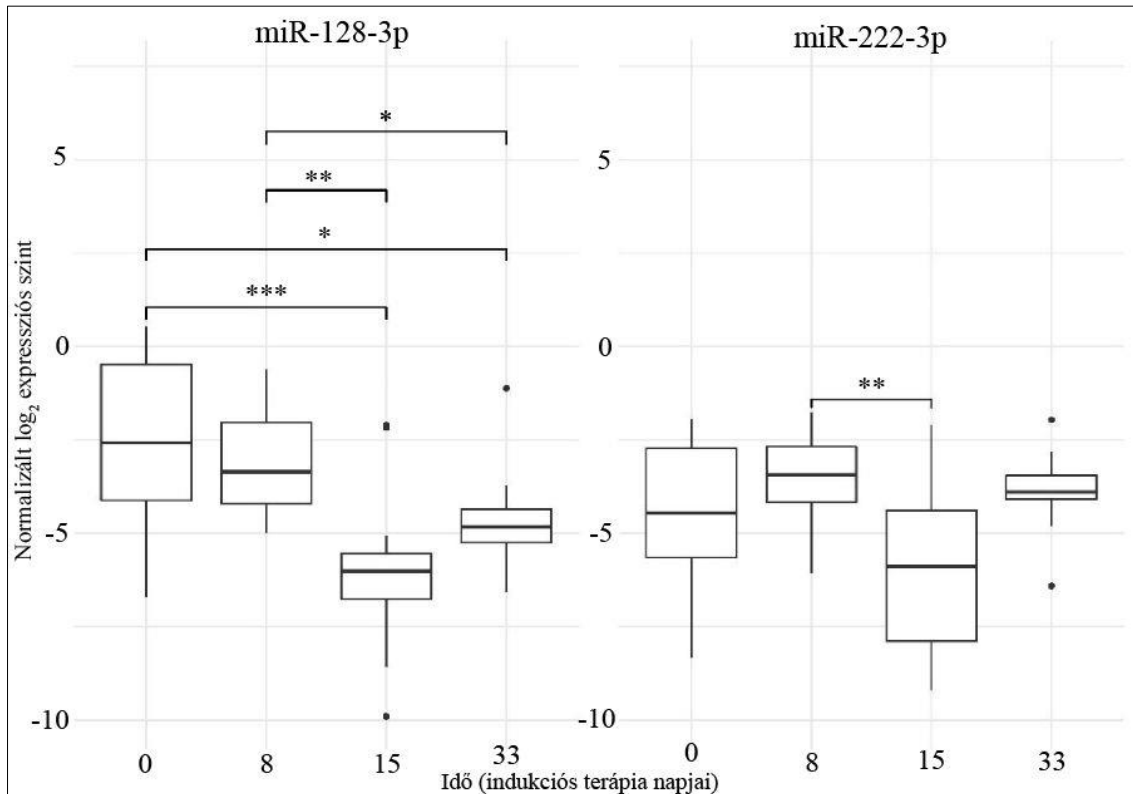
Összehasonlítottam a PFP-ben illetve az ebből származó exoszóma gazdag frakcióban (EEF) a miR-128-3p és a miR-222-3p expresszióját az indukciós terápia alatt 4 időpontban. Endogén kontrollként az irodalmi adatok alapján ebben a kísérleti felállásban a miR-16-5p-t használtam. A 7-8. ábra szemlélteti az expressziós szinteket és azok egymáshoz viszonyított változását.

EEF frakcióban a miR-128-3p expressziója szignifikánsan csökkent a 15. és 33. napra, míg a 8. napra jelentős expresszió csökkenést nem tudtunk kimutatni. A 33. napra azonban expressziós szint emelkedést láthatunk a 15. naphoz viszonyítva. A miR-222-3p esetén egyirányú változást nem találtam. Az expressziós szintek az egymást követő napok közt ugyan szignifikánsak, de összességében az expressziós változás nem azonos irányú (7. ábra).



7. ábra. MiR-128-3p és miR-222-3p expresszója az kezelés első hónapjában exoszóma gazdag frakcióban-ben mérve. A boxok a 2. és 3. kvartilist jelölik, a boxon belüli vastag vízszintes vonal a mediánt, az alsó függőleges a minimum értéket, amennyiben nincsen alsó kiugró érték, a felső függőleges vonal a maximum értéket, amennyiben nincsen felső kiugró érték vagy a $Q3 + 1,5 \cdot IQR$. A pontok a szélsőértékeket, a boxok feletti vonalak a szignifikáns korrelációt jelölik, ahol $p < 0,05$. *** esetén a $p: 0-0,001$; ** esetén $p: 0,001-0,01$; * esetén $p: 0,001-0,05$.

A miR-128-3p PFP-ben vizsgált változásáról elmondható, hogy a diagnosztikus mintához viszonyítva expressziós szint csökkenést detektáltam a 15. és 33. napra, azonban ahogyan az EEF mintákban, jelen esetben is expressziós szint emelkedést láthatunk a 33. napra a 15. napihoz viszonyítva. MiR-222-3p esetén egyetlen statisztikailag szignifikáns változást találtam, a 8-15. nap között (8. ábra).



8. ábra. MiR-128-3p és miR-222-3p expresszója az kezelés első hónapjában PFP-ben. A boxok a 2. és 3. kvartilist jelölik, a boxon belüli vastag vízszintes vonal a mediánt, az alsó függőleges a minimum értéket, amennyiben nincsen alsó kiugró érték, a felső függőleges vonal a maximum értéket, amennyiben nincsen felső kiugró érték vagy a $Q3+1,5 \cdot IQR$. A pontok a szélsőértékeket, a boxok feletti vonalak a szignifikáns korrelációt jelölik, ahol $p > 0,05$. *** esetén a $p: 0-0,001$; ** esetén $p: 0,001-0,01$; * esetén $p: 0,001-0,05$.

A 16. táblázat az ábrákhoz tartó számadatokat, azaz a mintavételi időpontok közötti expressziós változás \log_2 fold change-t részletezi. Mindkét mintaféleség esetén nem-ALL-es kontroll mintákhoz is elvégeztük az elemzést. EEF-ban nem különbözött szignifikánsan a diagnóziskori expressziós szint a kontrollokhoz viszonyítva egyik vizsgált mikroRNS esetén sem. A PFP frakcióban azonban mindkét mikroRNS tekintetében szignifikáns expressziós különbséget találtam. MiR-128-3p esetén 2,10 (adj. $p:2,89 \cdot 10^{-2}$), míg a miR-222-3p esetén 1,99 (adj. $p:1,87 \cdot 10^{-2}$) a \log_2 fold change.

16. táblázat. A mikroRNS expressziós változások \log_2 fold change EEF és PFP mintákban az indukciós terápia alatt perifériás vérben.

Mintavételi idő	miR-128-3p		miR-222-3p	
	EEF UC	PFP	EEF UC	PFP
0–8. nap	0,66 (NS)	1,42 (NS)	2,83 ($1,31 \cdot 10^{-4}$)	0,27 (NS)
0-15. nap	-4,49 ($1,31 \cdot 10^{-4}$)	-4,11 ($9,86 \cdot 10^{-4}$)	-1,68 ($7,71 \cdot 10^{-3}$)	-1,87 (NS)
0-33. nap	-2,23 ($1,42 \cdot 10^{-2}$)	-2,24 ($3,31 \cdot 10^{-2}$)	1,05 ($1,93 \cdot 10^{-2}$)	0,019 (NS)
8-15. nap	-4,22 ($1,49 \cdot 10^{-4}$)	-2,91 ($1,43 \cdot 10^{-3}$)	-4,39 ($8,11 \cdot 10^{-6}$)	-2,28 ($8,27 \cdot 10^{-3}$)
8-33. nap	-1,57 ($3,12 \cdot 10^{-2}$)	-1,20 ($1,87 \cdot 10^{-2}$)	-1,77 ($1,20 \cdot 10^{-3}$)	0,12 (NS)
15-33. nap	2,28 ($7,06 \cdot 10^{-3}$)	1,70 (NS)	2,70 ($9,7 \cdot 10^{-5}$)	2,10 (NS)

A zárójelben feltüntetett érték az adjusztált p érték. NS: nem szignifikáns

4.5. Az exoszóma gazdag frakció és PFP mintákban mért mikroRNS expressziós szintek változásainak összehasonlítása az MRD tükrében

Az EEF és PFP mintákban a miR-16-5p normalizálóval mért expressziós szint és annak változásait az indukciós terápia során korreláltattam a 15. napi áramlási citometriával mért MRD-vel illetve, további prognosztikai faktorokkal. A szignifikáns eredményeket a 17. táblázat tartalmazza.

17. táblázat. Klinikai paraméterek és a mikroRNS expressziós összefüggései EEF és PFP mintákban.

Mikro-RNS	Mintavételi időpontok	Fold change	Független változó	Minta-típus	Pearson r	Adjusz-tált p érték
miR-128-3p	0-8. nap	-0,66	15. nap FC MRD	EEF	0,99	$1,13 \cdot 10^{-9}$
	0-33. nap	-2,23	15. napi FC MRD	EEF	0,99	$1,20 \cdot 10^{-9}$
	0-8. nap	-1,42	15. napi FC MRD	PFP	0,99	$4,75 \cdot 10^{-9}$
	0-15. nap	-4,49	15. napi FC MRD	EEF	0,96	$4,89 \cdot 10^{-5}$
	0-33. nap	-2,43	15. napi FC MRD	PFP	0,94	$1,71 \cdot 10^{-3}$
miR-222-3p	0-8. nap	0,26	15. napi FC MRD	PFP	0,94	$1,89 \cdot 10^{-4}$
	8. nap	-3,59	8. napi absz. balszt szám a periférián	PFP	0,83	$2,84 \cdot 10^{-2}$
	0-15. nap	-1,87	33. napi absz. limfocitaszám	PFP	0,81	$3,55 \cdot 10^{-2}$
	0-15. nap	-1,87	15. napi FC MRD	PFP	0,79	$4,48 \cdot 10^{-2}$

5. Megbeszélés

Kutatásom során gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában szenvedő gyermekek perifériás vér, csontvelő és gerincvelői folyadék mintáit vizsgáltam azzal a céllal, hogy a jelenleg használt minimális maradék betegség mérésre használt módszernél érzékenyebb és kevésbé invazív módszert találjak. A hipotézisem szerint a perifériás vérből izolált cirkuláló mikroRNS-ek alkalmasak lehetnek MRD biomarkernek. Ennek vizsgálatát egy három lépcsőből álló kutatással valósítottam meg, mely során I. egy felfedező populáción vizsgáltam mindhárom mintaféleséget egyedi TLDA mikrofluidikus kártyán, majd II. kibővített populáción qPCR technikával 4 biomarker-jelölt mikroRNS expresszióját vizsgáltam perifériás vér PFP-ben végül pedig III. az exoszóma gazdag frakciót vizsgáltam 2 mikroRNS tekintetében. A mikroRNS expressziókat és annak változásait pedig az áramlási citometriával csontvelőben mért 15. napi MRD-vel és egyéb prognosztikai és klinikai paraméterekkel korreláltattam.

Kutatásom során vérlemezke-mentes plazmát vizsgáltam mind a csontvelő, mind pedig a perifériás vér esetén. A gerincvelői folyadékot nem centrifugáltam, hanem a teljes mintából izoláltam RNS-t a standardizáció hiánya és az erősen korlátozott rendelkezésre álló mintamennyiség miatt.

Az MRD-t jelenleg a klinikumban tipikusan csontvelői aspirátumból vizsgálják. Amennyiben a vérből könnyen vizsgálható mikroRNS-ek is nyújtanának elegendő és megbízható információt a csontvelői vagy akár központi idegrendszeri érintettségre vonatkozóan, úgy az általános anesztéziát igénylő csontvelői mintavétel elkerülhetővé válna.

A vérlemezkek igen gazdagok mikroRNS-ekben. Olyan mintaféleségre volt szükségem, amely nem tartalmazza a vérlemezke-eredetű mikroRNS-eket, ez pedig a PFP. A legtöbb kutatás nem PFP mintákat vizsgál, hanem csontvelőt, sejteket, sejtvonalakat (60, 64, 92, 99-103). Azonban az eredményeink nagyrészt egybeesnek az ezekben a kutatásokban leírtakkal. Tehát a perifériás vér és csontvelői PFP-ből izolált mikroRNS mintázat hasonlít a fent hivatkozott kutatások során a teljes perifériás vérből vagy csontvelőből izolált mononukleáris sejtek mikroRNS mintázatához.

Kutatásom legfőbb eredményeit összefoglalva elmondható, hogy I. felfedező populáción végzett TLDA mérés alapján a de novo ALL diagnóziskori perifériás vér PFP mintázata egészséges perifériás vér kontroll PFP-hez viszonyítva 19 mikroRNS esetén mutatott szignifikáns különbséget, ezek közül 18 esetén felülexpressziót, egy mikroRNS esetén alul expressziót tudtam kimutatni. Az ALL diagnózisa és az indukciós kezelés 33. napján vizsgált mikroRNS expresszió összesen 4 mikroRNS esetén volt szignifikánsan felülexpresszált. A II. kibővített populáción qPCR-rel ezt a négy mikroRNS-t (miR-128-3p, miR-181a-5p, miR-81b-5p, miR-222-3p) vizsgáltam a továbbiakban, melynek eredményeképpen azt találtam, hogy mindegyik mikroRNS szintje szignifikáns csökkenést mutatott a 8. illetve a 33. napra a diagnóziskori expresszióhoz viszonyítva. A miR-128-3p és a miR-222-3p a kezelés 8. napjára lecsökkenő expressziós szintje erősen korrelált a 15. napi áramlási citometriával mért csontvelő MRD-vel, azonban nem bizonyult annál érzékenyebb biomarkernek. Csakúgy, mint a III. exoszóma gazdag frakcióban vizsgált miR-128-3p és miR-222-3p expressziós változása sem.

Cirkuláló mikroRNS-eket vizsgált ALL-es betegek perifériás vérében (felnőtt és gyermek ALL-ben egyaránt) Luna-Aguirre és mtsai. Azonban itt nem sejteket és nem is PFP-t használtak, hanem EDTA-s csőbe levett perifériás vért, melyet sejtmentesítettek. Az eredményeik részben mutatnak átfedést az általam ígéretes biomarkernek tartott mikroRNS-ekkel: a miR-222 az egyetlen mikroRNS ami minkét kutatásban potenciális biomarker jelölt (88).

Swellam és csapata gyermek ALL-t vizsgált, pre-B, T- és bifenotípusos betegeket vegyesen. Ebben a kutatásban is szérumot vizsgáltak és csak két mikroRNS expresszióját elemezték, a miR-125b-1 és a miR-203-t. A miR-125b a mi mérésünk alapján nem különbözött szignifikánsan a kontroll mintáktól, a miR-203-at nem vizsgáltunk, mert expresszióját alacsonyabbnak találták a szakirodalomban ALL-ben egészségesekhez hasonlítva. Swellam konklúziója szerint, a kis betegcsoport ellenére, a két mikroRNS vizsgálata hasznos marker lehet az ALL diagnózisához (104).

Szintén cirkuláló mikroRNS-t elemzett Jiang, aki a miR-652-3p-re fókuszált amelynek expresszióját alacsonynak találta diagnóziskor és a komplett remisszióban pedig a diagnóziskorhoz képest emelkedettnek. Kutatásuk alapján ezt a mikroRNS-t hasznos

biomarkernek találják és feltételezik tumor szuppresszív funkcióját ALL-ben (105). Alacsony diagnóziskori szintje miatt mi nem vizsgáltuk ezt a mikroRNS-t.

De Oliveira 128 gyermek csontvelőjét vizsgálta vegyesen; pre B, pro B- és T-ALL-ben. Összesen 7 mikroRNS expresszióját mérte le mononukleáris sejtekben. Az általunk ígéretesnek tartott mindkét mikroRNS-t (miR-128-3p és miR-222-3p) vizsgálva egy igen kis betegcsoporton (n=5), a t(4;11) transzlokációs ALL esetén találtak asszociációt, azonban következtetéseket nem vontak le, az alacsony elemszám miatt (61).

Összevetve a mi méréseinket és eredményeinket a fenti keringő mikroRNS kutatásokkal, elmondható, hogy a vizsgált minták különbözősége, azaz a csontvelői sejtek, a sejtmentesített vér, illetve vérplazma versus PFP, továbbá a vegyes betegcsoportok (felnőtt és gyerek minták vegyesen, B és T sejtű ALL vegyesen) versus pre-B gyermek ALL miatt az eredményeink nem teljesen egyeznek. Azonban mindegyik kutatás konklúziója megegyezik a mi következtetésünkkel, miszerint a mikroRNS-eknek igen fontos szerepük lehet az ALL diagnosztikájában, MRD monitorozásában, azonban nagyobb betegszámú és specializáltabb betegcsoportokat volna szükséges vizsgálni.

TLDA kártyákon végzett előkísérletek során sikerült kiválasztanom 4 mikroRNS-t, amelyek az ALL-es mintákban felülexpresszáltak. Ezek az eredmények egybeesnek az irodalmi adatokkal. A TLDA kártyára kiválasztott potenciális biomarker mikroRNS-jelöltek mindegyike úgy került kiválasztásra, hogy az legalább két egymástól független közleményben szerepelt és ezek mindegyikében overexpressziójukat írták le (7. táblázat). A kártyára feltett normalizáló mikroRNS-jelöltek közül is ki tudtuk választani a megfelelő programok segítségével azt, amelyik leginkább stabilan expresszáldott a vizsgált mintákban (88-90).

A let-7 család két tagja is szerepelt a kiválasztott mikroRNS-ek között. Ez a család jellemzően vérlemezke-eredetű mikroRNS-ekből áll (91). Ezek vizsgálatának célja az volt, hogy megbizonyosodjak afelől, hogy a vizsgált mintákban a mikroRNS-ek a lehető legnagyobb valószínűséggel leukémiás blasztokból származnak és nem vérlemezke-eredetűek. Mivel a let-7 család vizsgált tagjainak expressziója alig volt mérhető, valóban a blasztokra tudtunk fókuszálni, nem a vérlemezke-eredetű mikroRNS-eket vizsgáltuk.

Nemes és mtsai vizsgálták a csontvelő és a perifériás vér sejtjeinek mikroRNS mintázatát 8 mikroRNS esetén pre B- és T-ALL-es gyermekeknél (n=24). Vizsgálatuk során nem találtak szignifikáns különbséget ugyanazon beteg csontvelői és perifériás vér mikroRNS expressziója között (64). Míg egy másik munkacsoport, szintén B és T sejtés gyermek ALL-t vizsgálva azt a megfigyelésüket írták le, miszerint a perifériás vér és csontvelő mikroRNS expresszió eltér egymástól (43 betegnél, 1136 mikroRNS-t elemezve) (101). Erős korrelációt mi sem találtunk a csontvelő PFP és perifériás vér PFP között a 46 mikroRNS-t vizsgálva. Azonban ennek háttérében a kis elemszámunk (n=20) is állhat.

A gerincvelői folyadék TLDA kártyán végzett vizsgálata során statisztikailag szignifikáns eredményt nem kaptam. Ennek oka feltételezhetően az igen alacsony elemszám lehet. A szakirodalomban gyermek ALL-es gerincvelői folyadék mikroRNS vizsgálatáról szóló publikációt nem találtam. Eredményünkből azonban az a következtetés vonható le, hogy az igen kis mennyiségű CSF mintából is izolálható keringő mikroRNS. Ennek a témakörnek további vizsgálata benyújtott közlemények és a munkacsoportban futó további kutatások tárgya.

A következő lépés során, a kibővített betegpopuláció perifériás vér PFP mintáit vizsgáltam három citogenetikai alcsoportra bontva. Így tehát validálásra kerültek a TLDA kártyán mért eredmények, másrészt az itt kapott eredményekkel további statisztikai analízist tudunk folytatni.

Egészséges kontrollokhoz viszonyítva más munkacsoportok is expressziós különbséget találtak számos mikroRNS esetén, ahogy mi is (88, 104-105). Juzenas és mtsai 162 egészséges önkéntes perifériás vérét vizsgálva létrehoztak egy sejtspecifikus mikroRNS katalógust, ahol vörösvértestek, exoszómák és a szérum mikroRNS expresszióját külön elemezték (106). Az általunk vizsgált 4 mikroRNS mindegyike jelen volt mind a vörösvértestekben, mind pedig a szérumban. Az exoszómális frakcióban csak a miR-181a-t detektálták. Az eredményük részben ellentmond a mi exoszóma gazdag frakció vizsgálatunk során mért eredményekkel. Mi ki tudtuk mutatni mind a miR-128-3p-t, mind pedig a miR-222-3p-t a vizsgált frakcióban, Juzenas és mtsai pedig nem detektálták. Ennek két magyarázata is lehet: 1. egészséges, felnőtt önkénteseket vizsgáltak, nem pedig

ALL-es gyermekeket. Ez esetleg arra enged következtetni, hogy ebben a frakcióban valós eltérés van bizonyos mikroRNS-ek jelenléte között, nem csak az expresszió mértékében van különbség. Illetve a felnőtt és gyermekekben expresszáldó mikroRNS-ek jelentősen eltérhetnek egymástól. Véleményem szerint ez utóbbi kevésbé valószínű, ismerve a tényt, hogy a mikroRNS-ek számos folyamatban részt vesznek. A másik lehetséges magyarázat pedig az, hogy mi exoszóma-gazdag frakciót vizsgáltunk, ultracentrifugálással izolálva. Az elnevezésünk oka pedig az, hogy amíg a MISEV 2018 szerinti kritérium rendszer nem teljesül az adott kutatásban az exoszóma frakció vizsgálatára vonatkozóan, addig nem lehet kijelenteni, hogy az izolált frakció tisztán exoszóma volna (83). Juzanes-ék a Life Technologies Total Exosome Isolation Reagent kitével izolálták az exoszómákat, a publikációjukban azonban nem szerepel a MISEV 2014 szerinti kritériumok vizsgálata (publikációjuk 2017-es, így az időben legközelebb álló, azaz 2014-es MISEV kritérium rendszerét használhatták volna) (107). Előfordulhat, hogy az általunk vizsgált frakcióban a precipitációs eljárás (a kit egy precipitációs módszer elvén működik, ahol a vizet megköti a mintában a reagens, így a nem vízzoldható részek centrifugálással kinyerhetőek) során nem maradt elég exoszóma, esetleg elveszett vagy nem azt a frakciót nyerték ki valójában, így abban esetleg nem tudtak bizonyos mikroRNS-eket detektálni. Annak ellenére tehát, hogy a szérum és plazma nem teljesen összehasonlítható mikroRNS expresszió tekintetében, elmondható, hogy egészséges emberekben is expresszáldóknak ezek a mikroRNS-ek. Így tehát feltételezhető, hogy az ALL-es beteg diagnóziskori magas expressziós szintje a leukémiás blasztokból származik, a kezelés során lecsökken, de nem várható egyértelműen, hogy szintjük detektálhatatlan szintre lecsökkenjen.

Az indukció terápia alatti expressziós szintek és azok változásait vizsgálva megállapítottuk, hogy az adott mintavételi időpontok közti expresszió változás jobb biomarker-jelölt mint az expressziós szint maga. A legjobbnak tűnő jelölt a miR-128-3p és a miR-222-3p normalizált expresszió változása a diagnózis és a 8. kezelési nap között. A citogenetikai alcsoportokat elemezve érdekes megfigyelés, hogy a hiperdiploid csoportban szignifikáns expressziós változást nem találtunk a 4 mikroRNS esetén. A t(12;21) és normál csoportban azonban hasonló képet láthatunk a miR-128-3p és miR-222-3p esetén. Az alcsoportok elemzése azonban megtévesztő lehet, mert alacsony elemszámmal számoltunk. Hiszen amint a három alcsoportot egyesítettük, statisztikailag

a fenti két mikroRNS expressziós változásai szignifikánsak lettek. Kutatásom során azonban nem volt céлом bizonyos citogenetikai alcsoportokra jellemző mikroRNS mintázatot leírni. A pre B-ALL-ben (a legjellemzőbb, legnagyobb hányadot kitevő csoportban) jellemző mikroRNS-t vagy mikroRNS-eket szerettem volna megtalálni, mely alkalmas lehet MRD mérésre perifériás vérből.

Az exoszóma gazdag frakció vizsgálatának főbb eredményei azért kerültek bele a dolgozatomba, mert logikus folytatása a perifériás vér PFP vizsgálatának és eredménye hasznos információt hordoz. Feltételezésünk az volt, hogy a normális sejteknél több exoszómát szekretáló leukémiás blasztok révén érzékenyebb, specifikusabb biomarkerhez juthatunk.

Először is, nem várt eredmény a hullámvasútra emlékeztető expressziós mintázat. A miR-128-3p esetén kevésbé, de a miR-222-3p esetén mind az EEF-ben, mind a PFP-ben jellemző. Az extracelluláris vezikulák a sejtek közti kommunikációban vesznek részt és elfogadott nézet, hogy ezek tartalma nem véletlen, tehát okkal kerül 'becsomagolásra' adott mikroRNS (75, 108). Így tehát az EEF-ben mért expressziós szintek csökkenése, majd emelkedése számos kérdést felvet, amely spekulációra ad okot a jelenlegi, nem teljesen feltérképezett működésű és funkciójú exoszómák világában. Felvetődik a gondolat miszerint akár a gyógyszeres kezelésre adott válaszként vagy épp nem-válaszként került kevesebb vagy több mikroRNS az EEF-be vizsgálatunk során. Ennek megválaszolására egy újabb, igen átfogó és szerteágazó vizsgálat adhatná meg a választ. A két potenciális mikroRNS esetén az EEF vizsgálatának a célja szintén az MRD biomarkerként való értékelése volt. A miR-222-3p esetén EEF-ben nem volt szignifikáns korreláció a 15. napi FC MRD-vel. Ennek hátterében állhat, hogy nem csak az exoszómákba csomagolódik, hanem azon kívül (például proteinekkal, úgymint az AGO2) is megtalálható, így amikor csak az EEF-t vizsgáljuk akkor bizonyos mennyiségű miR-222-3p expresszióját feltehetően nem detektáljuk. Megjegyzendő, hogy a PFP-ben az exoszóma frakció is megtalálható, míg az EEF miR-ek egy specifikusabb, kisebb részcsoportha a PFP miR-eknek.

A miR-128-3p expressziójának változása mind a PFP-ben, mind pedig az EEF-ben vizsgálva, a 0-8. és 0-33. nap közt is korrelál a 15. napi áramlási citometriával csontvelőben mért MRD-vel. Ez megerősíti a kutatás első felében kapott eredményünket,

a miR-128-3p expressziós szint változásának a korrelációját az áramlási citometriás MRD méréssel.

Nem tudok olyan publikációról, ahol exoszómális mikroRNS-eket vizsgáltak volna gyermekkori akut limfoblasztos leukémiában. Akut mieloid leukémiában azonban Hornick és kollégái hasonló vizsgálat során szerzett eredményeit publikálták és konklúziójuk szerint a szérumban exoszómális mikroRNS-ek hasznosak lehetnek az AML korai recidívájának vizsgálatában (77). Szolid tumoros kórképekben azonban számos publikáció született exoszómális mikroRNS-ek vizsgálatáról, mint potenciális biomarkerekről (109-112).

Az áramlási citometriás és az IgH qPCR MRD mérés során detektált számadatok azonban folyamatos, több logaritmikus csökkenést mutatnak a csontvelői blasztokat vizsgálva az indukció alatt (113-115). Az általunk vizsgált mikroRNS expressziós csökkenés azonban nem folyamatos a PFP-ben, csak a diagnózis és 8. nap közti csökkenés ér el ilyen mértéket. Ennek háttérében az állhat, hogy a perifériás vér PFP-ben mért diagnóziskori magas expressziós szint ugyan a leukémiás blasztokból származik, de a magas zajszt miatt a szenzitív betegségkövetés mégsem valósítható meg a terápia további mintavételi időpontjaiban vett mintákat elemezve. Ezt szintén alátámasztja a fentebb említett vizsgálat eredménye, miszerint egészséges emberek vérében is detektálták az általunk vizsgált mind a 4 mikroRNS-t (106). Továbbá az is, hogy a mikroRNS-ek számos szabályozó folyamatban vesznek részt egészséges emberben is. Az online mikroRNS adatbázisban jelenleg a miR-128-3p-nek 1254, a miR-222-3p-nek 619, a miR-181a-5p-nek és miR-181b-5p-nek pedig 1408 prediktált targete van (116).

A miR-128-at két gén kódolja, amik az R3HDM1 és RCS gének intronjaiba vannak beágyazva a 2q21.3 and 3p22.3 kromoszómákon (117).

Számos kutatás során bizonyításra került a miR-128 szabályozó szerepe a proliferációban, differenciációban és a különböző tumor sejtek apoptózisában. Ez utóbbi esetén például a miR-128-nak a BMI1 a targete ami a hematopoetikus őssejtek esetén fontos transzkripciós faktor és szorosan kapcsolódik a PI3K-AKT-mTOR jelátviteli úthoz. Ebből következtethető a tumorigenezisben betöltött szerepe (99, 118).

Leírtak pont mutációkat a miR-128b esetén MLL-AF4 ALL-es betegektől származó sejtekben, melynek hatására csökken az érett miR-128b szintje (119).

A promóter régió DNS metilációját vizsgálták ALL és AML-es betegeknél és azt találták, hogy ALL-ben 2,7%-kal alacsonyabb volt a metiláltság mint AML-ben, ebből pedig arra következtettek, hogy a miR-128b upregulációjának hátterében a promóter régiók CpG szigetek alacsony metiláltsági foka állhat (100).

Li és mtsai review cikkükben számos szolid tumor kórképben folytatott kutatást sorra vesznek, bemutatva a miR-128 tumorsejt proliferációra gyakorolt gátló vagy éppen aktiváló szerepét, a gyógyszer rezisztenciával való feltételezett kapcsolatát például emlő tumorban vagy nem kissejtes tüdő tumor esetén, de a tumor sejtek invázióját befolyásoló hatását is sorra veszik többek között petefészek tumor esetén (120).

In silico módszerek segítségével Georgantas és munkacsoportja a miR-128 és miR-181-et mint limfoid differenciáció igen jelentős szabályozóit írja le. A fenti két miR hatására valószínűleg a korai progenitor sejtek megállnak egy korai fejlődési fázisban, nem differenciálódnak tovább (121).

A miR-222 a Xp11.3 kromoszóma régióban helyezkedik el. Targete többek közt a proto-onkogén c-kit (tirozin kináz receptor), melynek szerepe a sejt differenciációban és növekedésben ismert (122-124). Ju és mtsai kutatása eredményeképp beszámol a miR-222 emelkedett expressziójáról gyermek ALL-es blasztokat vizsgálva (123). Ez egybeesik a mi eredményeinkkel is. Sajnos a miR-222 kapcsán igen kevés, a mi kutatásunkhoz kapcsolódó publikációról van tudomásom. Megemlíthető azonban, hogy prosztata, tüdő és pajzsmirigy tumorok esetén szintén vizsgálták ennek a mikroRNS-nek a szerepét (125-127).

A kutatásunk limitációja az alacsony betegszám volt. A mintagyűjtést 2016-ban kezdtük két budapesti kórházban. A hazai betegszámok tekintetében elmondható, hogy egészen sok mintát sikerült gyűjtenünk és használnunk a kutatásunkhoz. Sajnos kiestek azok a betegek, akiknek bármilyen okból nem volt meg mind a 4 időpontbeli mintája, és azok is, akik nem pre B-ALL-esek voltak, továbbá az 1 év alatti gyermekek is. Az indukciós terápia 33. napján végzett MRD vizsgálat eredménye mindegyik vizsgált betegünk esetén negatív volt, így azzal nem tudtunk érdemi statisztikai elemzést végezni. Túléléssel nem

tudtunk statisztikai elemzést végezni a mintagyűjtés közeli időpontjából adódóan. A vizsgálatunk ideje alatt elhalálozás igen alacsony számba fordult elő, így az azzal való elemzés nem lett volna valós információt hordozó.

A mikroRNS kutatások egyik legsarkalatosabb pontja a megfelelő normalizáló mikroRNS kiválasztása. Nincs standard normalizálóra ajánlás, a szakirodalomban is számos mikroRNS-t használnak (csak egyet vagy több kombinációját, endogént és/vagy spike in kontrollt). Ez is oka lehet annak, hogy a kutatások eredményei eltérnek egymástól néhány esetben. A TLDA kártyára kiválasztottam az irodalomban korábban használt legjellemzőbb normalizálókat, (leukémiára specifikusakat: miR-103a-3p, miR-638 miR-484, miR-30d-5p, miR-16-5p) hogy az eredményeink alapján ezekből ki tudjuk választani a számunkra megfelelőt (128-132). A PFP mintáinkhoz a miR-484 bizonyult a legmegfelelőbbnek, azaz expresszáldott a legstabilabban a mintákban.

A gerincvelői folyadék esetén ezzel a normalizálóval statisztikailag szignifikáns eredményt nem kaptunk. A gerincvelői folyadék minták megfelelő elemzéséhez emelt elemszám szükséges, illetve újabb statisztikai elemzéssel megállapítani az erre a mintatípusra leginkább alkalmas normalizáló mikroRNS-t.

Az exoszóma-gazdag frakcióban a miR-484 számos mintában nem volt detektálható, így a miR-16-5p-t használtuk referencia mikroRNS-nek.

A fentiekben említett mikroRNS-ek mind endogén kontrollok, azonban a nem humán spike-in referenciák használatára is számos példa van a szakirodalomban. Annak ellenére, hogy a cel-miR-39 spike in kontrollt minden mintához hozzáadtam és annak szintjét mindegyik vizsgálatunk során lemértük, nem használtuk a statisztikai elemzéseinkhez.

A vizsgálatom erőssége és újdonsága azonban nem elhanyagolható. Gyermekkori pre-B akut limfoblasztos leukémiában MRD mérésére cirkuláló mikroRNS-ek vizsgálata perifériás vérben, ismereteim szerint újdonság. Számos, korábban hivatkozott kutatás foglalkozott gyermekkori ALL mikroRNS vizsgálatával, de egyik sem a perifériás vér PFP-jét elemezte MRD követés céljából, egy potenciális, kevésbé invazív biomarkert keresve.

Ugyan a 8. napra lecsökkenő mikroRNS szint erősen korrelál a 15. napi áramlási citometriával mért csontvelő MRD-vel, sajnos nem bizonyult érzékenyebb biomarkernek,

mert a hosszabb távú (33 napos) expressziós változás mértéke alul marad a jelenlegi standard módszerekhez képest. Érdekes eredmény azonban, hogy a 8. napon mért expressziós változás előrejelíti a 15. napi áramlási citometria MRD eredményét. Ez mindenképpen új információ, habár szükséges volna nagyobb populáción megismételni a vizsgálatot hosszabb követési idővel, nem csak az indukciós terápia ideje alatt. Megjegyzendő, hogy a 8. napig csak szteroidot kapnak a gyerekek, a többi gyógyszer, citosztatikum csak ezután lép be a kezelési rezsimbe.

6. Következtetések

1. Munkám során akut limfoblasztos leukémiában szenvedő gyermekek csontvelői és perifériás vér vérlemezke-mentesített plazmájából és gerincevelői folyadék mintáiból TaqMan Low Density Array kártyákon sikerült azonosítanunk számos mikroRNS felülexpresszióját egészséges kontroll gyermekek perifériás vér vérlemezke-mentesített plazmájához viszonyítva.
2. Valós idejű qPCR metodikát használva kibővített populáción perifériás vér PFP mintákat vizsgálva validáltuk a korábbi mérést és statisztikai elemzést végeztünk az indukciós terápia alatti mikroRNS expresszió és annak változása tekintetében. Ennek eredményeképpen megállapítható, hogy a vizsgált négy mikroRNS expressziója a diagnóziskori mintában detektálthoz képest a kezelés 8. napjára csökkenést mutatott, azonban a további időpontokra (15. és 33. nap) nem volt további szignifikáns csökkenés.
3. Megállapítható a mérésünk alapján, hogy a normalizált expressziós szint változás jobb MRD biomarker mint az expressziós szint maga.
4. A miR-128-3p és a miR-222-3p diagnóziskori és 8. napi perifériás vér vérlemezke-mentesített mintákban mért expressziós változás korrelál a 15. napi áramlási citometriával mért MRD-vel.
5. Az exoszóma-gazdag frakció vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a miR-128-3p a diagnózis és 8. nap, a diagnózis és a 15. nap illetve a diagnózis és a 33. nap közti expressziós változása korrelációt mutatott a 15. napi áramlási citometriával mért MRD-vel, így tehát megerősítette a miR-128-3p putatív biomarker szerepét.
6. Kutatásom eredményeképpen elmondható, hogy a miR-128-3p és miR-222-3p expressziós vizsgálata nem bizonyult szenzitívebbnek, mint a jelenleg hazánkban használt áramlási citometriás minimális maradék betegség mérési módszer.
7. A vizsgált mikroRNS-eket nagyobb populáción és további mintavételi időpontban is vizsgálva talán megbízhatóbb eredményt nyújtanának a biomarkerként való értékelésük tekintetében.

7. Összefoglalás

Az akut limfoblasztos leukémia a gyermekek körében a leggyakoribb malignitás. A korszerű terápiáknak és a minimális maradék betegség rendszeres monitorozásának köszönhetően az ötéves túlélés mára már 80% feletti.

Célunk egy, a jelenleg hazánkban alkalmazott áramlási citometriával a csontvelői aspirátumból mért minimális maradékbetegség monitorozásnál kevésbé invazív és szenzitívebb biomarker megtalálása. Ennek érdekében csontvelői és perifériás vér vértsejt-mentesített plazma, illetve gerincvelői folyadék mintákat vizsgáltunk TaqMan Low Density Array kártyákon, 22 beteg esetén, mint felfedező populáción. Ezen mérés eredményei alapján kiválasztottunk négy potenciális biomarker-jelölt mikroRNS-t. Ezeket a mikroRNS-eket perifériás vér PFP mintákban, bővített populáción (n=28) qPCR módszert alkalmazva vizsgáltuk majd korreláltattuk az áramlási citometriás MRD mérés eredményével és egyéb klinikai paraméterekkel. Ennek eredményeképpen megállapítottuk, hogy mind a 4 vizsgált mikroRNS expressziója az indukciós kezelés 8. napjára szignifikánsan lecsökken a diagnóziskori mintában mérthez képest. További csökkenést azonban nem detektáltunk. A miR-128-3p és a miR-222-3p diagnóziskori és a 8. nap közti expressziós szint változása korrelált a 15. napi áramlási citometriás MRD-vel. MRD biomarkerként való alkalmazása azonban eredményeink alapján nem nyújtana előnyt, hiszen annak szenzitivitása alul maradt az áramlási citometriás vizsgálatok érzékenységétől.

Az exoszóma-gazdag frakció izolálása ultracentrifugálással történt 13 beteg esetén. A miR-128-3p és a miR-222-3p mikroRNS-eket vizsgáltuk a korábbiakkal megegyező módon. Az ebben a frakcióban mért miR-222-3p expressziós szint változása nem mutatott statisztikailag szignifikáns korrelációt a 15. napi MRD-vel, míg a miR-128-3p esetén a diagnóziskori és 8. napi expressziós szinten túl a diagnóziskori és a 15. illetve a 33. napi expressziós szint változás is korrelált. Ez alapján tehát megerősítettük a miR-128-3p expressziójának változását a gyermekkori ALL indukciós terápiája alatt.

Összességében tehát eredményeink hozzájárulnak a mikroRNS-ek, mint potenciális, kevésbé invazív biomarkerek gyermekkori ALL-ben való értékeléséhez.

8. Summary

Acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is the most common haematological malignancy among children. Due to recent advancement of therapy and the monitoring of minimal residual disease (MRD) the 5 year survival is above 80%.

Our aim was to find a less invasive and more sensitive biomarker for minimal residual disease monitoring than flow cytometry (FC) which is the currently used method in clinical practice in Hungary. In a discovery population (n=22 patients) platelet-free plasma (PFP) samples of peripheral blood and bone marrow aspirate as well as cerebrospinal fluid samples were tested using custom TaqMan Low Density Array cards. Based on these measurements, four biomarker candidate microRNAs were selected for further investigation. The expression of the 4 microRNAs in peripheral blood PFP samples were measured on an expanded cohort (n=28 patients) by qPCR. Results were correlated with flow cytometry MRD and further clinical parameters. The expression of all 4 microRNAs decreased significantly by day 8 of therapy compared to day of diagnosis. Further decrease was not detected at later time points. In case of miR-128-3p and miR-222-3p the expression changes between day 0 and day 8 showed correlation with day 15 FC MRD. However, their use as MRD biomarkers is of no benefit because their sensitivity is lower than that of current gold standard MRD detection methods.

Exosome-enriched fraction (EEF) was isolated by ultracentrifugation (n=13 patients). Mir-128-3p and miR-222-3p expression was measured by qPCR. In this fraction changes of the expression of miR-222-3p do not correlate with day 15 FC MRD while miR-128-3p expression changes between day 0, and day 8, and day 15 also correlated with day 15 FC MRD.

Based on our results it is confirmed that circulating miR-128-3p expression changes during the induction therapy of paediatric ALL.

To conclude, our results contribute to the knowledge on microRNAs as less invasive biomarker candidates in paediatric acute lymphoblastic leukaemia.

9. Irodalomjegyzék

1. O'leary, M., Krailo, M., Anderson, J. R., Reaman, G. H. & Children's Oncology, G. (2008). Progress in childhood cancer: 50 years of research collaboration, a report from the Children's Oncology Group. *Seminars in oncology*, 35, 484-493.
2. Kaseb, H. & Gupta, G. (2019). *Cancer, Lymphoblastic Lymphoma*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.
3. Garami, M., Schuler, D. & Jakab, Z. (2014). [Importance of the National Childhood Cancer Registry in the field of paediatric oncology care in Hungary]. *Orv Hetil*, 155, 732-739.
4. Whitlock J, G. P. (2009). Acute lymphoblastic leukemia in children. In: GREER J, F. J., RODGERS G, ET AL. (ed.) *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia, PA,: Lippincott Williams & Wilkins.
5. Terwilliger, T. & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*, 7, e577-e577.
6. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M. & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127, 2391-2405.
7. Lam, K. & Zhang, D. E. (2012). RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17, 1120-1139.
8. Castillo, L., D. Janic, S. Belgrad, A.P.D.J. Jazbec, E. Kaiserova, J. Konja, G. & Kovacs, J. K., L.Y. Soykan ALL IC-BFM 2009.
9. Janossy, G., Bollum, F. J., Bradstock, K. F. & Ashley, J. (1980). Cellular phenotypes of normal and leukemic hemopoietic cells determined by analysis with selected antibody combinations. *Blood*, 56, 430-441.
10. Hurwitz, C. A., Loken, M. R., Graham, M. L., Karp, J. E., Borowitz, M. J., Pullen, D. J. & Civin, C. I. (1988). Asynchronous antigen expression in B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 72, 299-307.
11. D'auriol, L., Macintyre, E., Galibert, F. & Sigaux, F. (1989). In vitro amplification of T cell gamma gene rearrangements: a new tool for the assessment of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia*, 3, 155-158.

12. Hansen-Hagge, T. E., Yokota, S. & Bartram, C. R. (1989). Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by in vitro amplification of rearranged T-cell receptor delta chain sequences. *Blood*, 74, 1762-1767.
13. Brisco, M. J., Condon, J., Hughes, E., Neoh, S. H., Sykes, P. J., Seshadri, R., Toogood, I., Waters, K., Tauro, G., Ekert, H. & Et Al. (1994). Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukaemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet*, 343, 196-200.
14. Coustan-Smith, E., Sandlund, J. T., Perkins, S. L., Chen, H., Chang, M., Abromowitch, M. & Campana, D. (2009). Minimal disseminated disease in childhood T-cell lymphoblastic lymphoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*, 27, 3533-3539.
15. Campana, D. & Coustan-Smith, E. (1999). Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry*, 38, 139-152.
16. Lucio, P., Parreira, A., Van Den Beemd, M. W., Van Lochem, E. G., Van Wering, E. R., Baars, E., Porwit-Macdonald, A., Bjorklund, E., Gaipa, G., Biondi, A., Orfao, A., Janossy, G., Van Dongen, J. J. & San Miguel, J. F. (1999). Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia*, 13, 419-427.
17. Ciudad, J., San Miguel, J. F., Lopez-Berges, M. C., Vidriales, B., Valverde, B., Ocqueteau, M., Mateos, G., Caballero, M. D., Hernandez, J., Moro, M. J., Mateos, M. V. & Orfao, A. (1998). Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 16, 3774-3781.
18. Van Dongen, J. J. M., Macintyre, E. A., Gabert, J. A., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., Parreira, A., Gameiro, P., Díaz, M. G., Malec, M., Langerak, A. W., San Miguel, J. F. & Biondi, A. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*, 13, 1901-1928.
19. Gabert, J., Beillard, E., Van Der Velden, V. H., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela, J. M., Cave, H., Pane, F., Aerts, J. L.,

- De Micheli, D., Thirion, X., Pradel, V., Gonzalez, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G. & Van Dongen, J. J. (2003). Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*, 17, 2318-2357.
20. Van Der Velden, V. H., Cazzaniga, G., Schrauder, A., Hancock, J., Bader, P., Panzer-Grumayer, E. R., Flohr, T., Sutton, R., Cave, H., Madsen, H. O., Cayuela, J. M., Trka, J., Eckert, C., Foroni, L., Zur Stadt, U., Beldjord, K., Raff, T., Van Der Schoot, C. E. & Van Dongen, J. J. (2007). Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*, 21, 604-611.
 21. Neale, G. a. M., Coustan-Smith, E., Stow, P., Pan, Q., Chen, X., Pui, C. H. & Campana, D. (2004). Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 18, 934-938.
 22. Neale, G. A., Coustan-Smith, E., Pan, Q., Chen, X., Gruhn, B., Stow, P., Behm, F. G., Pui, C. H. & Campana, D. (1999). Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 13, 1221-1226.
 23. Kerst, G., Kreyenberg, H., Roth, C., Well, C., Dietz, K., Coustan-Smith, E., Campana, D., Koscielniak, E., Niemeyer, C., Schlegel, P. G., Muller, I., Niethammer, D. & Bader, P. (2005). Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol*, 128, 774-782.
 24. Biondi, A., Valsecchi, M. G., Seriu, T., D'aniello, E., Willemse, M. J., Fasching, K., Pannunzio, A., Gadner, H., Schrappe, M., Kamps, W. A., Bartram, C. R., Van Dongen, J. J. M. & Panzer-Grümayer, E. R. (2000). Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group. *Leukemia*, 14, 1939-1943.
 25. Van Der Velden, V. H. J., Corral, L., Valsecchi, M. G., Jansen, M. W. J. C., De Lorenzo, P., Cazzaniga, G., Panzer-Grümayer, E. R., Schrappe, M., Schrauder,

- A., Meyer, C., Marschalek, R., Nigro, L. L., Metzler, M., Basso, G., Mann, G., Den Boer, M. L., Biondi, A., Pieters, R. & Van Dongen, J. J. M. (2009). Prognostic significance of minimal residual disease in infants with acute lymphoblastic leukemia treated within the Interfant-99 protocol. *Leukemia*, 23, 1073-1079.
26. Dogliotti, I., Drandi, D., Genuardi, E. & Ferrero, S. (2018). New Molecular Technologies for Minimal Residual Disease Evaluation in B-Cell Lymphoid Malignancies. *J Clin Med*, 7.
 27. Sánchez, R., Ayala, R. & Martínez-López, J. (2019). Minimal Residual Disease Monitoring with Next-Generation Sequencing Methodologies in Hematological Malignancies. *Int J Mol Sci*, 20, 2832.
 28. Kruse, A., Abdel-Azim, N., Kim, H. N., Ruan, Y., Phan, V., Ogana, H., Wang, W., Lee, R., Gang, E. J., Khazal, S. & Kim, Y.-M. (2020). Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*, 21, 1054.
 29. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75.
 30. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, 855-862.
 31. Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W. & Pasquinelli, A. E. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell*, 64, 320-333.
 32. Vasudevan, S. (2012). Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 3, 311-330.
 33. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 14, 1902-1910.
 34. Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G. & Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *Rna*, 9, 277-279.

35. Rajewsky, N. (2006). L(ou)sy miRNA targets? *Nat Struct Mol Biol*, 13, 754-755.
36. Alles, J., Fehlmann, T., Fischer, U., Backes, C., Galata, V., Minet, M., Hart, M., Abu-Halima, M., Grässer, F. A., Lenhof, H.-P., Keller, A. & Meese, E. (2019). An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res*, 47, 3353-3364.
37. Jambor, I., Szabo, K., Zeher, M. & Papp, G. (2019). [The importance of microRNAs in the development of systemic autoimmune disorders]. *Orv Hetil*, 160, 563-572.
38. Olena, A. F. & Patton, J. G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *Journal of cellular physiology*, 222, 540-545.
39. Macfarlane, L.-A. & Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11, 537-561.
40. Mohr, A. M. & Mott, J. L. (2015). Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis*, 35, 3-11.
41. Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G. A. & Croce, C. M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*, 12, 580-587.
42. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-297.
43. Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F. & Tewari, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 5003-5008.
44. Cheng, L., Sun, X., Scicluna, B. J., Coleman, B. M. & Hill, A. F. (2014). Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney Int*, 86, 433-444.
45. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J. & Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18, 997-1006.

46. Cogswell, J. P., Ward, J., Taylor, I. A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., Kelnar, K., Kemppainen, J., Brown, D., Chen, C., Prinjha, R. K., Richardson, J. C., Saunders, A. M., Roses, A. D. & Richards, C. A. (2008). Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *J Alzheimers Dis*, 14, 27-41.
47. Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I. & Illei, G. G. (2012). The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One*, 7, e30679.
48. Zhou, Q., Li, M., Wang, X., Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhou, X., Wang, X., Gao, X. & Li, X. (2012). Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *Int J Biol Sci*, 8, 118-123.
49. Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J. & Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56, 1733-1741.
50. Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K. & Pogosova-Agadjanyan, E. L. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105.
51. Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S. & Tewari, M. (2010). Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 50, 298-301.
52. Wang, K., Yuan, Y., Cho, J.-H., McClarty, S., Baxter, D. & Galas, D. J. (2012). Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One*, 7, e41561-e41561.
53. Marrugo-Ramírez, J., Mir, M. & Samitier, J. (2018). Blood-Based Cancer Biomarkers in Liquid Biopsy: A Promising Non-Invasive Alternative to Tissue Biopsy. *Int J Mol Sci*, 19, 2877.
54. Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D. & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 13, 423-433.
55. Johanson, T. M., Skinner, J. P. J., Kumar, A., Zhan, Y., Lew, A. M. & Chong, M. M. W. (2014). The role of microRNAs in lymphopoiesis. *International Journal of Hematology*, 100, 246-253.

56. Hu, Y. & Li, S. (2016). Survival regulation of leukemia stem cells. *Cell Mol Life Sci*, 73, 1039-1050.
57. Zhang, H. & Chen, Y. (2009). New insight into the role of miRNAs in leukemia. *Science in China Series C: Life Sciences*, 52, 224-231.
58. Xiao, C., Calado, D. P., Galler, G., Thai, T. H., Patterson, H. C., Wang, J., Rajewsky, N., Bender, T. P. & Rajewsky, K. (2007). MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*, 131, 146-159.
59. Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F. & Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 303, 83-86.
60. Zhang, H., Luo, X.-Q., Zhang, P., Huang, L.-B., Zheng, Y.-S., Wu, J., Zhou, H., Qu, L.-H., Xu, L. & Chen, Y.-Q. (2009). MicroRNA Patterns Associated with Clinical Prognostic Parameters and CNS Relapse Prediction in Pediatric Acute Leukemia. *PLoS One*, 4, e7826.
61. De Oliveira, J. C., Brassesco, M. S., Scrideli, C. A., Tone, L. G. & Narendran, A. (2012). MicroRNA expression and activity in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Pediatr Blood Cancer*, 59, 599-604.
62. Fulci, V., Colombo, T., Chiaretti, S., Messina, M., Citarella, F., Tavoraro, S., Guarini, A., Foa, R. & Macino, G. (2009). Characterization of B- and T-lineage acute lymphoblastic leukemia by integrated analysis of MicroRNA and mRNA expression profiles. *Genes Chromosomes Cancer*, 48, 1069-1082.
63. Schotte, D., De Menezes, R. X., Akbari Moqadam, F., Khankahdani, L. M., Lange-Turenhout, E., Chen, C., Pieters, R. & Den Boer, M. L. (2011). MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 96, 703-711.
64. Nemes, K., Csóka, M., Nagy, N., Márk, Á., Váradi, Z., Dankó, T., Kovács, G., Kopper, L. & Sebestyén, A. (2015). Expression of Certain Leukemia/Lymphoma Related microRNAs and its Correlation with Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pathology & Oncology Research*, 21, 597-604.
65. Organista-Nava, J., Gómez-Gómez, Y., Illades-Aguilar, B., Del Carmen Alarcón-Romero, L., Saavedra-Herrera, M. V., Rivera-Ramírez, A. B., Garzón-Barrientos, V. H. & Leyva-Vázquez, M. A. (2015). High miR-24 expression is associated

- with risk of relapse and poor survival in acute leukemia. *Oncol Rep*, 33, 1639-1649.
66. Kaddar, T., Rouault, J. P., Chien, W. W., Chebel, A., Gadoux, M., Salles, G., Ffrench, M. & Magaud, J. P. (2009). Two new miR-16 targets: caprin-1 and HMGA1, proteins implicated in cell proliferation. *Biol Cell*, 101, 511-524.
 67. Xu, J., Li, C.-X., Li, Y.-S., Lv, J.-Y., Ma, Y., Shao, T.-T., Xu, L.-D., Wang, Y.-Y., Du, L., Zhang, Y.-P., Jiang, W., Li, C.-Q., Xiao, Y. & Li, X. (2011). MiRNA-miRNA synergistic network: construction via co-regulating functional modules and disease miRNA topological features. *Nucleic Acids Res*, 39, 825-836.
 68. Faber, J., Gregory, R. I. & Armstrong, S. A. (2008). Linking miRNA regulation to BCR-ABL expression: the next dimension. *Cancer Cell*, 13, 467-469.
 69. Yuana, Y., Sturk, A. & Nieuwland, R. (2013). Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev*, 27, 31-39.
 70. Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J. & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med*, 183, 1161-1172.
 71. Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J. & Lotvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-659.
 72. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*, 113, 1-11.
 73. Van Der Pol, E., Boing, A. N., Harrison, P., Sturk, A. & Nieuwland, R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*, 64, 676-705.
 74. Ghosh, A. K., Secreto, C. R., Knox, T. R., Ding, W., Mukhopadhyay, D. & Kay, N. E. (2010). Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood*, 115, 1755-1764.
 75. Huan, J., Hornick, N. I., Shurtleff, M. J., Skinner, A. M., Goloviznina, N. A., Roberts, C. T., Jr. & Kurre, P. (2013). RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes. *Cancer Res*, 73, 918-929.

76. Bacher, U., Schnittger, S. & Haferlach, T. (2010). Molecular genetics in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol*, 22, 646-655.
77. Hornick, N. I., Huan, J., Doron, B., Goloviznina, N. A., Lapidus, J., Chang, B. H. & Kurre, P. (2015). Serum Exosome MicroRNA as a Minimally-Invasive Early Biomarker of AML. *Sci Rep*, 5, 11295.
78. Simons, M. & Raposo, G. (2009). Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 575-581.
79. Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J. & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9.
80. Palma, J., Yaddanapudi, S. C., Pigati, L., Havens, M. A., Jeong, S., Weiner, G. A., Weimer, K. M., Stern, B., Hastings, M. L. & Duelli, D. M. (2012). MicroRNAs are exported from malignant cells in customized particles. *Nucleic Acids Res*, 40, 9125-9138.
81. Ge, Q., Zhou, Y., Lu, J., Bai, Y., Xie, X. & Lu, Z. (2014). miRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules*, 19, 1568-1575.
82. Properzi, F., Logozzi, M. & Fais, S. (2013). Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark Med*, 7, 769-778.
83. Thery, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A. C., Bergese, P., Bielska, E., Blenkiron, C., Bobis-Wozowicz, S., Boilard, E., Boireau, W., Bongiovanni, A., Borrás, F. E., Bosch, S., Boulanger, C. M., Breakefield, X., Breglio, A. M., Brennan, M. A., Brigstock, D. R., Brisson, A., Broekman, M. L., Bromberg, J. F., Bryl-Gorecka, P., Buch, S., Buck, A. H., Burger, D., Busatto, S., Buschmann, D., Bussolati, B., Buzas, E. I., Byrd, J. B., Camussi, G., Carter, D. R., Caruso, S., Chamley, L. W., Chang, Y. T., Chen, C., Chen, S., Cheng, L., Chin, A. R., Clayton, A., Clerici, S. P., Cocks, A., Cocucci, E., Coffey, R. J., Cordeiro-Da-Silva, A., Couch, Y., Coumans, F. A., Coyle, B., Crescitelli, R., Criado, M. F., D'souza-Schorey, C., Das, S., Datta Chaudhuri, A., De Candia, P., De Santana, E. F., De Wever, O., Del Portillo, H.

- A., Demaret, T., Deville, S., Devitt, A., Dhondt, B., Di Vizio, D., Dieterich, L. C., Dolo, V., Dominguez Rubio, A. P., Dominici, M., Dourado, M. R., Driedonks, T. A., Duarte, F. V., Duncan, H. M., Eichenberger, R. M., Ekstrom, K., El Andaloussi, S., Elie-Caille, C., Erdbrugger, U., Falcon-Perez, J. M., Fatima, F., Fish, J. E., Flores-Bellver, M., Forsonits, A., Frelet-Barrand, A., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 7, 1535750.
84. Mitchell, A. J., Gray, W. D., Hayek, S. S., Ko, Y.-A., Thomas, S., Rooney, K., Awad, M., Roback, J. D., Quyyumi, A. & Searles, C. D. (2016). Platelets confound the measurement of extracellular miRNA in archived plasma. *Sci Rep*, 6, 32651.
 85. Lacroix, R., Judicone, C., Mooberry, M., Boucekine, M., Key, N. S., Dignat-George, F. & Workshop, T. I. S. (2013). Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11, 1190-1193.
 86. Marabita, F., De Candia, P., Torri, A., Tegnér, J., Abrignani, S. & Rossi, R. L. (2016). Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Briefings in Bioinformatics*, 17, 204-212.
 87. Schwarzenbach, H., Da Silva, A. M., Calin, G. & Pantel, K. (2015). Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem*, 61, 1333-1342.
 88. Luna-Aguirre, C. M., De La Luz Martinez-Fierro, M., Mar-Aguilar, F., Garza-Veloz, I., Trevino-Alvarado, V., Rojas-Martinez, A., Jaime-Perez, J. C., Malagon-Santiago, G. I., Gutierrez-Aguirre, C. H., Gonzalez-Llano, O., Salazar-Riojas, R., Hidalgo-Miranda, A., Martinez-Rodriguez, H. G., Gomez-Almaguer, D. & Ortiz-Lopez, R. (2015). Circulating microRNA expression profile in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Biomark*, 15, 299-310.
 89. Vilella, F., Moreno-Moya, J. M., Balaguer, N., Grasso, A., Herrero, M., Martinez, S., Marcilla, A. & Simon, C. (2015). Hsa-miR-30d, secreted by the human

- endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development*, 142, 3210-3221.
90. Rinnerthaler, G., Hackl, H., Gampenrieder, S. P., Hamacher, F., Hufnagl, C., Hauser-Kronberger, C., Zehentmayr, F., Fastner, G., Sedlmayer, F., Mlineritsch, B. & Greil, R. (2016). miR-16-5p Is a Stably-Expressed Housekeeping MicroRNA in Breast Cancer Tissues from Primary Tumors and from Metastatic Sites. *Int J Mol Sci*, 17.
 91. Ple, H., Landry, P., Benham, A., Coarfa, C., Gunaratne, P. H. & Provost, P. (2012). The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PLoS One*, 7, e50746.
 92. De Oliveira, J. C., Scrideli, C. A., Brassesco, M. S., Morales, A. G., Pezuk, J. A., Queiroz Rde, P., Yunes, J. A., Brandalise, S. R. & Tone, L. G. (2012). Differential miRNA expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and association with clinical and biological features. *Leuk Res*, 36, 293-298.
 93. Han, B.-W., Feng, D.-D., Li, Z.-G., Luo, X.-Q., Zhang, H., Li, X.-J., Zhang, X.-J., Zheng, L.-L., Zeng, C.-W., Lin, K.-Y., Zhang, P., Xu, L. & Chen, Y.-Q. (2011). A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. *Hum Mol Genet*, 20, 4903-4915.
 94. Harada, M., Pokrovskaja-Tamm, K., Soderhall, S., Heyman, M., Grandér, D. & Corcoran, M. (2012). Involvement of miR17 pathway in glucocorticoid-induced cell death in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 53, 2041-2050.
 95. Diakos, C., Zhong, S., Xiao, Y., Zhou, M., Vasconcelos, G. M., Krapf, G., Yeh, R. F., Zheng, S., Kang, M., Wiencke, J. K., Pombo-De-Oliveira, M. S., Panzer-Grumayer, R. & Wiemels, J. L. (2010). TEL-AML1 regulation of survivin and apoptosis via miRNA-494 and miRNA-320a. *Blood*, 116, 4885-4893.
 96. Neilson, J. R., Zheng, G. X., Burge, C. B. & Sharp, P. A. (2007). Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev*, 21, 578-589.
 97. Avigad, S., Verly, I. R., Lebel, A., Kordi, O., Shichrur, K., Ohali, A., Hameiri-Grossman, M., Kaspers, G. J., Cloos, J., Fronkova, E., Trka, J., Luria, D.,

- Kodman, Y., Mirsky, H., Gaash, D., Jeison, M., Avrahami, G., Elitzur, S., Gilad, G., Stark, B. & Yaniv, I. (2016). miR expression profiling at diagnosis predicts relapse in pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*, 55, 328-339.
98. Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M. A., Bernad, A. & Sanchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*, 2, 282.
 99. Han, B. W., Feng, D. D., Li, Z. G., Luo, X. Q., Zhang, H., Li, X. J., Zhang, X. J., Zheng, L. L., Zeng, C. W., Lin, K. Y., Zhang, P., Xu, L. & Chen, Y. Q. (2011). A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. *Hum Mol Genet*, 20, 4903-4915.
 100. Mi, S., Lu, J., Sun, M., Li, Z., Zhang, H., Neilly, M. B., Wang, Y., Qian, Z., Jin, J., Zhang, Y., Bohlander, S. K., Le Beau, M. M., Larson, R. A., Golub, T. R., Rowley, J. D. & Chen, J. (2007). MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 19971-19976.
 101. Duyu, M., Durmaz, B., Gunduz, C., Vergin, C., Yilmaz Karapinar, D., Aksoylar, S., Kavakli, K., Cetingul, N., Irken, G., Yaman, Y., Ozkinay, F. & Cogulu, O. (2014). Prospective evaluation of whole genome microRNA expression profiling in childhood acute lymphoblastic leukemia. *BioMed research international*, 2014, 967585-967585.
 102. Schotte, D., Chau, J. C., Sylvester, G., Liu, G., Chen, C., Van Der Velden, V. H., Broekhuis, M. J., Peters, T. C., Pieters, R. & Den Boer, M. L. (2009). Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 23, 313-322.
 103. Shafik, R. E., Abd El Wahab, N., Senoun, S. A., Ebeid, E. & El Taweel, M. A. (2018). Expression of Micro-RNA 128 and Let-7b in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Cases. *Asian Pac J Cancer Prev*, 19, 2263-2267.

104. Swellam, M., Hashim, M., Mahmoud, M. S., Ramadan, A. & Hassan, N. M. (2018). Aberrant Expression of Some Circulating miRNAs in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biochem Genet*, 56, 283-294.
105. Jiang, Q., Lu, X., Huang, P., Gao, C., Zhao, X., Xing, T., Li, G., Bao, S. & Zheng, H. (2018). Expression of miR-652-3p and Effect on Apoptosis and Drug Sensitivity in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biomed Res Int*, 2018, 5724686.
106. Juzenas, S., Venkatesh, G., Hübenthal, M., Hoepfner, M. P., Du, Z. G., Paulsen, M., Rosenstiel, P., Senger, P., Hofmann-Apitius, M., Keller, A., Kupcinskas, L., Franke, A. & Hemmrich-Stanisak, G. (2017). A comprehensive, cell specific microRNA catalogue of human peripheral blood. *Nucleic Acids Res*, 45, 9290-9301.
107. Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., Ghossein, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W. & Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 3, 26913-26913.
108. Gyorgy, B., Szabo, T. G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., Laszlo, V., Pallinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A. & Buzas, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*, 68, 2667-2688.
109. McDonald, A. C., Vira, M., Shen, J., Sanda, M., Raman, J. D., Liao, J., Patil, D. & Taioli, E. (2018). Circulating microRNAs in plasma as potential biomarkers for the early detection of prostate cancer. *Prostate*, 78, 411-418.
110. Ostfeld, M. S., Jensen, S. G., Jeppesen, D. K., Christensen, L. L., Thorsen, S. B., Stenvang, J., Hvam, M. L., Thomsen, A., Mouritzen, P., Rasmussen, M. H., Nielsen, H. J., Orntoft, T. F. & Andersen, C. L. (2016). miRNA profiling of circulating EpCAM(+) extracellular vesicles: promising biomarkers of colorectal cancer. *J Extracell Vesicles*, 5, 31488.
111. Kim, S., Choi, M. C., Jeong, J. Y., Hwang, S., Jung, S. G., Joo, W. D., Park, H., Song, S. H., Lee, C., Kim, T. H. & An, H. J. (2019). Serum exosomal miRNA-

- 145 and miRNA-200c as promising biomarkers for preoperative diagnosis of ovarian carcinomas. *J Cancer*, 10, 1958-1967.
112. Wu, H., Wang, Q., Zhong, H., Li, L., Zhang, Q., Huang, Q. & Yu, Z. (2020). Differentially expressed microRNAs in exosomes of patients with breast cancer revealed by nextgeneration sequencing. *Oncol Rep*, 43, 240-250.
 113. Schumich, A., Maurer-Granofszky, M., Attarbaschi, A., Potschger, U., Buldini, B., Gaipa, G., Karawajew, L., Printz, D., Ratei, R., Conter, V., Schrappe, M., Mann, G., Basso, G. & Dworzak, M. N. (2019). Flow-cytometric minimal residual disease monitoring in blood predicts relapse risk in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in trial AIEOP-BFM-ALL 2000. *Pediatr Blood Cancer*, 66, e27590.
 114. Conter, V., Bartram, C. R., Valsecchi, M. G., Schrauder, A., Panzer-Grumayer, R., Moricke, A., Arico, M., Zimmermann, M., Mann, G., De Rossi, G., Stanulla, M., Locatelli, F., Basso, G., Niggli, F., Barisone, E., Henze, G., Ludwig, W. D., Haas, O. A., Cazzaniga, G., Koehler, R., Silvestri, D., Bradtke, J., Parasole, R., Beier, R., Van Dongen, J. J., Biondi, A. & Schrappe, M. (2010). Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*, 115, 3206-3214.
 115. Basso, G., Veltroni, M., Valsecchi, M. G., Dworzak, M. N., Ratei, R., Silvestri, D., Benetello, A., Buldini, B., Maglia, O., Masera, G., Conter, V., Arico, M., Biondi, A. & Gaipa, G. (2009). Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol*, 27, 5168-5174.
 116. Wong, N. & Wang, X. (2014). miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res*, 43, D146-D152.
 117. Lutter, D., Marr, C., Krumsiek, J., Lang, E. W. & Theis, F. J. (2010). Intronic microRNAs support their host genes by mediating synergistic and antagonistic regulatory effects. *BMC Genomics*, 11, 224.
 118. Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M. & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 627-644.

119. Kotani, A., Ha, D., Schotte, D., Armstrong, S. A. & Lodish, H. F. (2010). A novel mutation in the miR-128b gene reduces miRNA processing and leads to glucocorticoid resistance of MLL-AF4 Acute Lymphocytic Leukemia cells. *Cell Cycle*, 9, 1037-1042.
120. Li, M., Fu, W., Wo, L., Shu, X., Liu, F. & Li, C. (2013). miR-128 and its target genes in tumorigenesis and metastasis. *Experimental Cell Research*, 319, 3059-3064.
121. Georgantas, R. W., 3rd, Hildreth, R., Morisot, S., Alder, J., Liu, C. G., Heimfeld, S., Calin, G. A., Croce, C. M. & Civin, C. I. (2007). CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 2750-2755.
122. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20.
123. Ju, X., Li, D., Shi, Q., Hou, H., Sun, N. & Shen, B. (2009). Differential microRNA expression in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*, 26, 1-10.
124. Simmons, P. J., Aylett, G. W., Niutta, S., To, L. B., Juttner, C. A. & Ashman, L. K. (1994). c-kit is expressed by primitive human hematopoietic cells that give rise to colony-forming cells in stroma-dependent or cytokine-supplemented culture. *Exp Hematol*, 22, 157-165.
125. Galardi, S., Mercatelli, N., Giorda, E., Massalini, S., Frajese, G. V., Ciafre, S. A. & Farace, M. G. (2007). miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*, 282, 23716-23724.
126. Garofalo, M., Quintavalle, C., Di Leva, G., Zanca, C., Romano, G., Taccioli, C., Liu, C. G., Croce, C. M. & Condorelli, G. (2008). MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 27, 3845-3855.
127. He, H., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Franssila, K., Suster, S., Kloos, R. T., Croce, C. M. & De La

- Chapelle, A. (2005). The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 19075-19080.
128. Rice, J., Roberts, H., Rai, S. N. & Galandiuk, S. (2015). Housekeeping genes for studies of plasma microRNA: A need for more precise standardization. *Surgery*, 158, 1345-1351.
 129. Muller, V., Gade, S., Steinbach, B., Loibl, S., Von Minckwitz, G., Untch, M., Schwedler, K., Lubbe, K., Schem, C., Fasching, P. A., Mau, C., Pantel, K. & Schwarzenbach, H. (2014). Changes in serum levels of miR-21, miR-210, and miR-373 in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy: a translational research project within the Geparquinto trial. *Breast Cancer Res Treat*, 147, 61-68.
 130. Song, J., Bai, Z., Han, W., Zhang, J., Meng, H., Bi, J., Ma, X., Han, S. & Zhang, Z. (2012). Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci*, 57, 897-904.
 131. Mcdermott, A. M., Kerin, M. J. & Miller, N. (2013). Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer studies. *PLoS One*, 8, e83718.
 132. Drobna, M., Szarzynska-Zawadzka, B., Daca-Roszak, P., Kosmalka, M., Jaksik, R., Witt, M. & Dawidowska, M. (2018). Identification of Endogenous Control miRNAs for RT-qPCR in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*, 19.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezésben felhasznált közlemények:

Rzepiel Andrea, Nóra Kutszegi, András Gézsi, Judit C. Sági, Bálint Egyed, György Péter, Henriett Butz, Gábor Nyíró, Judit Müller, Gábor T. Kovács, Csaba Szalai, Ágnes F. Semsei, Dániel J. Erdélyi: Circulating microRNAs as minimal residual disease biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of translational medicine* 17:372. 2019.

IF: 4,124 (D1)

Bálint Egyed, Nóra Kutszegi, Judit C. Sági, András Gézsi, **Andrea Rzepiel**, Tamás Visnovitz, Péter Lőrincz, Judit Müller, Marianna Zombori, Csaba Szalai, Dániel J. Erdélyi, Gábor T. Kovács, Ágnes F. Semsei: MicroRNA-181a as novel liquid biopsy marker of central nervous system involvement in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of translational medicine* 18:250. 2020.

IF: 4,124

Rzepiel Andrea, Nóra Kutszegi, Judit C. Sági, Andrea Kelemen, Krisztina Palóczy, Ágnes F. Semsei, Edit Buzás, Dániel J. Erdélyi: Extracelluláris vesiculák és hematológiai malignitásokban játszott szerepük. *Orvosi Hetilap* 157 (35): 1379-1384. 2016.

IF: 0,349

Egyéb eredeti közlemények:

Egyed B., G. T. Kovács, N. B. Kutszegi, **A. Rzepiel**, J. Cs. Sági, D. J. Erdélyi, J. Müller, A. F. Semsei: New and traditional directions in the biology and management of childhood acute lymphoblastic leukemia . *Orvosi Hetilap* 159 (20): 786-797. 2018.

Sági J. C., B. Egyed, A. Kelemen, N. Kutszegi, M. Hegyi, A. Gézsi, M. A. Herlitschke, **A. Rzepiel**, L. E. Fodor, G. Ottóffy, G. T. Kovács, D. J. Erdélyi, Cs. Szalai, A. F. Semsei: Variations in *ABCC2*, *NQO1* and *CYP3A5* genes might influence the risk of cardiotoxicity in pediatric acute lymphoblastic leukemia and osteosarcoma. *BMC Cancer* 18(1):704. 2018.

Más témában megjelent közlemények:

Laczikó D., E. Répási, **A. Rzepiel**, E. Kerekes, K. Shenker-Horváth, A. Koller, G. Elbert, Zs. B. Nagy: A vérnyomást befolyásoló genetikai tényezők diagnosztikája, és a magas vérnyomás genetikai rizikófaktorai. Hypertonia és Nephrologia 19(6): 252-6. 2015.

Kerekes É., K. Shenker-Horváth, E. Répási, V. Szokolai, **A. Rzepiel**, A. Koller, Zs. B. Nagy: Az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) génváltozatainak sportélettani vonatkozásai és hatása a magas vérnyomásra. Új Diéta 5: 7-9. 2015.

Dinnyés A., **A. Rzepiel**, V. Vass: Orvosi Nobel-díj 2012. Újraprogramozott sejtjeink. Temészet világa 144(2): 50-53. 2013.

Rzepiel A., Zs. Bíró, P. Lehotzky, L. Ózsvári, M. Horvai-Szabó, Z. B. Nagy: Házimacska genombankjának kialakítása és gyakorlati jelentősége a Maine Coon fajta modelljén keresztül. Magyar Állatorvosok Lapja 135: 543-548. 2013.

Nagy Zs. B., **A. Rzepiel**, Á. Szabára, M. Heltai, S. Csányi, P. Lehotzky, L. Ózsvári: Az aranyakál magyarországi helyzete, genetikai térképezésének fontossága és felhasználási lehetőségei. Magyar Állatorvosok Lapja 135: 149-158. 2013.

Rzepiel A., M. Horvai-Szabó, Sz. Monoki, L. Ózsvári, P. Lehotzky, Zs. B. Nagy: A hazai komondorállomány DNS-biobankjának létrehozása és felhasználási területei. Magyar Állatorvosok Lapja 134: 620–627. 2012.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom **Dr. Erdélyi Dániel**nek, témavezetőmnek a szakmai irányításáért és támogatásáért, és nem hivatalos témavezetőimnek is, **Félné dr. Semsei Ágnes**nek és **Prof. Dr. Szalai Csabának** a rengeteg segítségért, tanításért és bátorításért, amiket az elmúlt 5 évben kaptam tőlük. Köszönöm, hogy nyertes pályázataikkal keretet biztosítottak munkámhoz. Köszönöm a SE II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika volt igazgatójának, **Prof. Dr. Szabó András**nak, hogy befogadott és biztosította PhD munkámat. Nagyon köszönöm a Klinika jelenlegi igazgatójának, **Prof. Dr. Kovács Gábornak** a folyamatos támogatást és segítséget.

A Magyar Gyermekhematológusok és Gyermekonkológusok Társaságának támogatását, hiszen pályázataikkal hozzájárultak a kutatásaim megvalósításához.

Nagyon köszönöm **Borszékiné Dr. Kutszegi Nóra** munkáját, tanácsait, bátorítását és hálás vagyok, hogy szakmai tudásával hozzájárult ezen kutatás megvalósulásához.

Hálával tartozom **Dr. Gézsi András**nak a statisztikai kiértékelésekben és az informatikai megközelítésekben nyújtott sok segítségéért, ötleteiért, magyarázataiért és megbízható munkájáért.

Nagyon köszönöm **Sándorné Vángor Mónika**nak a laboratóriumban nyújtott segítség és tanítás mellett a bátorítást és folyamatos támogatást, melyet a munkám során tanúsított. Köszönöm **Csányiné dr. Sági Judit**nak a részvételét a mintagyűjtésben, az együtt gondolkozásban. Hálás vagyok a szakmai, szervezési és csapatépítő feladatokba fektetett rengeteg energiájáért. Köszönöm az együtt dolgozást **Egyed Bálint**nek, a statisztikai elemzésben nyújtott segítségét és újszerű ötleteit. Köszönöm a TDK hallgatók: **Altner Anna, Horváth Anna** és **Wappler Abigél** munkáját.

Köszönettel tartozom az SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológia Intézet minden munkatársának, kiemeltém **Prof. Dr. Buzás Edit**nek, hogy befogadott, laboratóriumait használhattam a munkám során.

Köszönöm **Dr. Patócs Attilának** és kollégáinak, **Dr. Nyíró Gábornak** és **Dr. Butz Heriettnak**, hogy mérésünk egy részét náluk elvégezhettem el.

A 2. számú Gyermekgyógyászati Klinika Hematológiai és Onkológiai osztály továbbá a Heim Pál Gyermekkorház Onkohematológiai osztályának orvosai, nővérei és betegei nélkül a mintagyűjtés nem valósulhatott volna meg, így ezúton is köszönöm segítségüket.

Azonban kiemelten köszönetet érdemel **Dr. Müller Judit, Dr. Csóka Mónika és Dr Péter György.**

Különleges köszönetet érdemel **Horvainé Dr. Szabó Mária**, akit az egyetemi éveim kezdetén ismerhettem meg, nagyszerű tanárként és témavezetőként. Nélküle nem indultam volna el ezen a hosszú úton, melynek végén megszületett ez a disszertáció.

Végül köszönöm szüleimnek, páromnak és a családomnak a támogatást, segítséget, bátorítást, tanácsaikat és szeretetüket, amely nélkül ez a munka nem születhetett volna meg.